



Title	下水汚泥中内分泌かく乱物質の汚泥処理過程及び土壌環境中での挙動
Author(s)	南山, 瑞彦
Citation	北海道大学. 博士(工学) 乙第7066号
Issue Date	2018-12-25
DOI	10.14943/doctoral.r7066
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/72362
Type	theses (doctoral)
File Information	Mizuhiko_Minamiyama.pdf



[Instructions for use](#)

下水汚泥中内分泌かく乱物質の
汚泥処理過程及び土壌環境中での挙動

Fates of endocrine disruptors
in sewage sludge treatment process and land application of composted
sewage sludge

2018年12月

南山 瑞彦

目 次

第 1 章 序 論

1.1	本研究の目的	1
1.2	下水道分野での微量化学物質に関する研究	2
1.2.1	下水道分野での微量化学物質に関する水質リスク研究の必要性	2
1.2.2	下水汚泥を対象とした微量化学物質に関する研究	2
1.3	内分泌かく乱物質に関する知見	4
1.3.1	内分泌かく乱物質	4
1.3.2	エストロゲン	5
1.3.3	ノニルフェノール類	11
1.4	本研究の構成	17

第 2 章 下水汚泥試料中のノニルフェノール類の分析手法

2.1	はじめに	22
2.2	下水汚泥試料中のノニルフェノール、 ノニルフェノールエトキシレートの抽出方法	24
2.2.1	検討内容	24
2.2.2	検討方法と結果	26
2.3	下水汚泥試料中のノニルフェノールエトキシカルボン酸類の分析	31
2.3.1	検討方法	31
2.3.2	検討結果	32
2.4	まとめ	32

第 3 章 下水汚泥処理系におけるノニルフェノール類の挙動

3.1	はじめに	35
3.2	嫌気性消化過程におけるノニルフェノールエトキシレートの挙動	37
3.2.1	実験方法	37
3.2.2	分析方法	37
3.2.3	実験結果	39

3.3	嫌気性消化過程におけるノニルフェノールエトキシカルボン酸類の挙動	40
3.3.1	実験方法	40
3.3.2	分析方法	40
3.3.3	実験結果	41
3.4	考察	42
3.5	まとめ	44
第4章 下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動		
4.1	はじめに	47
4.2	ライシメータ実験	48
4.2.1	実験方法	48
4.2.2	分析方法	49
4.2.3	実験結果と考察	52
4.3	植物体への移行確認実験	59
4.3.1	実験方法	59
4.3.2	実験結果	59
4.4	まとめ	61
第5章 結論		
		64

第1章 序論

1.1 本研究の目的

人や野生生物の内分泌作用をかく乱し、生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると考えられている物質等（以下、内分泌かく乱物質）による環境汚染が各国で報告されている。これらの物質は、社会活動や日常生活にともない環境中に放出されているとされており、我が国においても環境中に広範囲にわたって存在していることが明らかとなってきた。下水道事業はその流域での社会活動や個々の生活様式と密接に関係するものであることからこれらの物質とも無縁ではなく、その監視方法や制御方法の確立が必要となると考えられる。

建設省が1998年度（平成10年度）に行った「水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査」¹⁾の結果によると、内分泌かく乱物質が下水処理場へ流入し、それらの濃度が低下した後、放流されている様子が伺われた。また、国土交通省の「平成12年度 下水道における内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）に関する調査報告」²⁾でも、内分泌かく乱物質の多くが下水道の水処理系において除去されていることが報告されている。これらの結果は、内分泌かく乱物質が下水道の水処理系において分解除去されている、または汚泥系へ移行している可能性を示している。したがって、下水処理場における内分泌かく乱物質の監視方法や制御方法を確立するためには、汚泥処理プロセスを構成する個々の処理工程での内分泌かく乱物質の挙動・消長を明らかにすることが必要である。また、下水汚泥の有効利用が進められていく中で、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の消長を明らかにすることが重要であり、そのためには施用先の状況を再現した実験施設による長期間の調査が必要である。

そのため、本研究では、1990年代からその内分泌かく乱作用が疑われていたノニルフェノールを中心に、下水汚泥試料中のノニルフェノール類の分析手法、下水汚泥処理系におけるノニルフェノール類の挙動、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動を明らかにすることを目的とした。

1.2 下水道分野での微量化学物質に関する研究

1.2.1 下水道分野での微量化学物質に関する水質リスク研究の必要性

下水道整備の進展にともない、下水道が流域の水環境に占める位置づけも大きくなっている³⁾⁴⁾。社会経済活動を通じ、多種多様な化学物質、医薬品等が多く利用されているが、それらの一部は排水とともに下水道に流入し下水道施設等を経由して公共用水域に放流され、人の健康や生態系に影響を与える可能性が懸念されている⁵⁾。さらに、内分泌かく乱作用のように、人の生命活動そのものに関わる物質を含む物質群が生態系に影響を与える可能性が指摘されるようになっている。そのため、下水道の処理対象である汚濁物質や法令に基づき特定事業場から下水道への排除が制限されている有害物質、一般家庭から下水道に排出されるものも含めた各種の物質の下水道における挙動と環境への排出の状況を把握する努力が必要であると考えられる。

国土交通省が2014年に策定した新下水道ビジョン⁶⁾でも、水質リスクの現状として「微量化学物質については、水環境中で検出されるものの、濃度と人体への影響、生態系への影響等不明な点が多い。また、水生生物の生息環境の保全等の観点から、水質環境基準の検討が進められている。」その対応として、「生態系に影響を与えうる化学物質等について下水道における挙動を把握するなどして排除の制限、下水処理の高度化等を検討するとともに、生態系に配慮した水処理方法や、未規制物質対策、水質事故対応技術等について知見を収集し、指針の改定等必要な対応を図る」ことで、中期目標として「化学物質等の生態系への影響把握を進め、生態系に配慮した下水道事業を実施し、生態系の保全・再生を図る」ことをめざしている。さらに、新下水道ビジョンを受けて策定された下水道技術ビジョンでは、リスク管理を技術開発分野として位置付け、リスク評価に基づく下水道における化学物質管理システムの構築、水生生態系の保全・再生等のための影響評価手法の開発、環境中における微量汚染物質の測定技術の確立と影響評価等を、技術目標として掲げている⁷⁾。

以上のように、下水道分野での微量化学物質に関する水質リスク研究は重要な研究分野である。

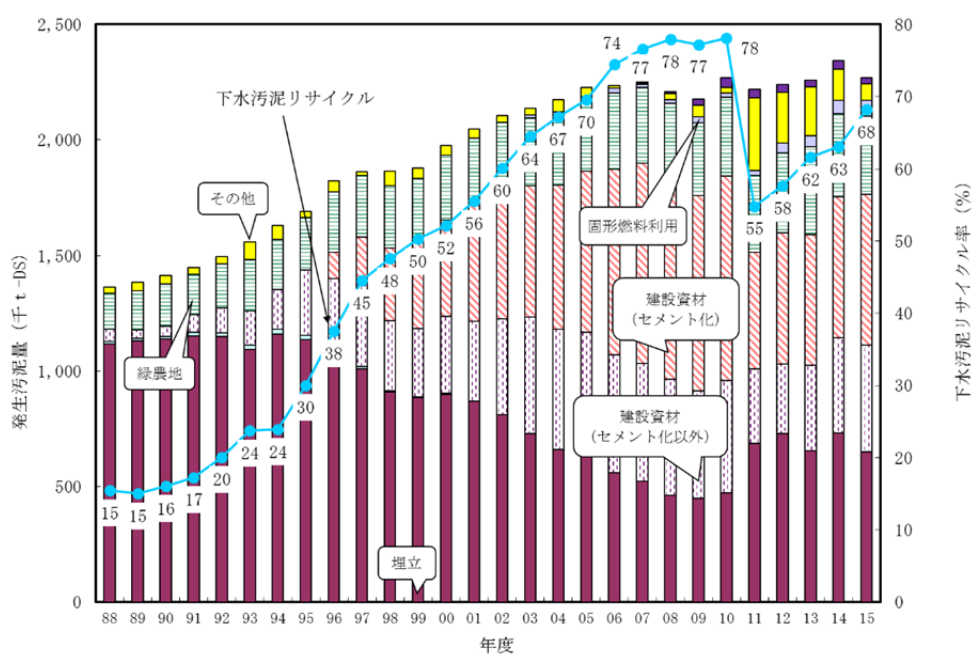
1.2.2 下水汚泥を対象とした微量化学物質に関する研究

下水道は、流域に広く存在する、水資源、無機物資源、有機物資源を集めるシステムでもある。これら、下水道に集まる資源を有効に活用することは、循環型社会システムの構築に資するものであり、地域の課題解決や発展に貢献できる可能性を持っていると考えられる。たとえば、リン鉱石資源を持たないわが国にとって重要な戦略的物質であるとの指摘がなされているリンが下水道に流入する量は、年間約5.4万t(2012年度)と推計されており⁸⁾、農業・食品に関わるリンの輸入量のうち約1割が下水道を経由して移動していることになる⁹⁾。下水汚泥リサイクル率の推移を図1.1に示す¹⁰⁾。リンがコンポスト等として活用されているのは、下水道が集めているリンのさらに1割程度ということになる⁹⁾¹⁰⁾。

以上の状況も踏まえ、2015年7月に施行された改正下水道法では、下水道管理者は、発生汚泥等

を処理する場合の減量化に係る努力義務に加え、下水汚泥が燃料又は肥料として再生利用されるよう努めることが明確化された¹¹⁾。これにより、発生汚泥等の処理施設の更新にあたっては、汚泥を燃料又は肥料として再生利用するための再生施設の整備を優先的に検討することとなった^{3) 11)}。さらに、下水汚泥の農業利用に関しては、2013年8月より食と下水道の連携強化に向けた取組（BISTRO 下水道）が推進されている。これは、汚泥肥料の科学的な有効性の確認に裏付けられた、先進的な取組情報の共有、下水道資源を利用して栽培した食材の魅力向上等に向けた取組である³⁾。

ここまで示したように、下水汚泥の農業利用の推進が企られているが、そのためには下水汚泥リサイクル製品の品質が適切な安全性を保っている必要がある。汚泥肥料等、下水汚泥リサイクル製品の生産者等としての位置づけにある下水道事業者は、その製品の信用を保つよう努力すべきであり、可能な限り新しい科学的知見を取り入れ、その信用の醸成を図る必要があると考えられる。汚泥肥料については重金属管理手引書¹²⁾に基づく品質管理を行うなど、良質な肥料の生産が進められている。このように既に影響が把握されている物質に関する安全性の確保は進んでいる一方で、内分泌かく乱等、新たに指摘された現象に関わる物質の影響については知見が少ない。これらの物質の多くは微量な有機物であり、分析自体が困難で、その実態が明らかではない場合が多いと考えられる。これまで知見が少ないために問題として認識できていなかったことは少なからず存在しているものと考えられる。たとえば、内分泌かく乱物質の一つとされているビスフェノール A (BPA) を対象とした報告では、スコットランドの羊の放牧場の下水汚泥を長期連用した箇所で土壌に BPA が蓄積し、牧草とともに直接土壌を摂食する羊などへの BPA の移動の可能性が指摘されている¹³⁾。このように、下水汚泥を対象とした微量化学物質の挙動に関する研究を進める必要があると考えられる。



※汚泥処理の途中段階である消化ガス利用は含まれない。
 ※2011年度のその他は、97.6%が場内ストックである。

出典:国土交通省ホームページ

図 1.1 日本における発生汚泥量と下水汚泥リサイクル率の推移¹⁰⁾

1.3 内分泌かく乱物質に関する知見

1.3.1 内分泌かく乱物質

化学物質は生活を豊かにする一方で、適切に取り扱われない場合、人の健康や生態系に影響をおよぼす可能性があるため、化学物質がもたらす環境リスクの適切な評価と管理は世界共通の課題であると考えられる。化学物質が人の健康や生態系におよぼす可能性のある影響のうち、内分泌系をかく乱する作用については、科学的に未解明な点が多いものの、世代を越えた影響をもたらすおそれがある課題として国内外の関心を集めてきた。また、「奪われし未来」¹⁴⁾が1996年に出版され、一般にも内分泌かく乱作用に関する認識が広まることとなった。

英国では、精巢内に卵を生成している雌雄同体魚の発見から、河川における雄魚の雌性化という現象について1980年代後半から研究が進められてきた。フィールド調査と被疑物質による曝露試験によって得られた研究成果から、雄魚の雌性化を引き起こす要因は、主として下水処理場から放流される人畜由来の天然エストロゲンである17β-エストラジオール(E2)とエストロン(E1)、そして医薬品(ピル)として使用されている合成エストロゲンの17α-エチニルエストラジオール(EE2)であることが明らかにされた¹⁵⁾。また、非イオン界面活性剤の分解産物の一つであるノニルフェノール(NP)等のアルキルフェノールが羊毛洗浄工場から多量に排出された河川でも、同様の魚類影響が引き起こされたことも明らかにされた¹⁶⁾。英国で、下水処理場の下流河川に棲息する魚類に、顕著な雌性化が見られるとの報告がなされたことから¹⁷⁾、日本においても、下水処理水の生態系への影響が懸念された。

環境庁は1998年に「内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED'98—」、そして、2005年に環境省が「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—」を策定し、内分泌かく乱作用に関する知見の収集と検討を行ってきた。環境省は、2010年に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2010—」を策定し、化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験・評価の枠組みを構築するとともに、これに必要となる試験手法の開発を国際的な協力の下で進めてきた。環境省は2016年に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する対応—EXTEND2016—」をとりまとめ、「環境行政の中で化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し、必要に応じて管理していくことを目標として、化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の確立と評価の実施を加速化することに力点を置く」というEXTEND2010の基本理念を引き続き推進していくこととしている¹⁸⁾。そしてEXTEND2016では、「化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し必要に応じて管理していくことを目標」として、「作用・影響の評価及び試験法の開発」、「環境中濃度の実態把握及びばく露の評価」、「リスク評価及びリスク管理」等を進めていくとしている¹⁸⁾。

生物の内分泌作用をかく乱し生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると思われる物質等(内分泌かく乱物質)のうち、1990年代より影響を及ぼす可能性が指摘されていたエストロゲンとNP類に着目し、以下に知見を整理する。

1.3.2 エストロゲン

(1) エストロゲンの物性等

エストロゲンは、女性ホルモンの一種である。生体内で分泌されるステロイド系エストロゲン、イソフラボン誘導体などの植物エストロゲン、合成エストロゲンおよびエストロゲン酸がある¹⁹⁾。ヒトのエストロゲンとしては20種類以上確認されているが、エストロン (E1)、17β-エストラジオール (E2)、エストリオール (E3) が大部分であるとされている¹⁹⁾。

主な人畜由来の天然エストロゲン (E1、E2、E3) およびその抱合体の例、合成エストロゲンの一つである17α-エチニルエストラジオール (EE2) の構造を図1.2、図1.3に示す。E2とE1は可逆反応の関係にある。抱合体は、エストロゲンに硫酸基等がついたものである。

エストロゲン等の物性値とエストロゲン様活性値の例を表1.1に示す^{20) 21)}。表1.1で示したRelative estrogenic activityや比活性値は、各物質のエストロゲンとしての働きの強さをE2との比率として表しており、Relative estrogenic activityはMELN (*in vitro*)^{20) 22)}、比活性値は遺伝子組み換え酵母を用いた活性の測定 (Yeast Estrogen Screen (YES))^{21) 23)}によって得られた値から算出されたものである。測定方法は複数あり、それぞれ感度が異なる等の特徴がある²⁴⁾。

天然エストロゲンは尿にも含まれている。尿中に排出される際には、主として硫酸抱合体、グルクロンサン抱合体等、E1、E2、E3の各種抱合体となっている¹⁹⁾。表1.1のとおり、エストロゲンとしての活性をE2と比較した場合、抱合体の活性は非常に低い。脱抱合により活性の高い遊離体となるため、環境中でのエストロゲン様活性の挙動を解明するには、これらの形態の変化を把握する必要がある。

合成エストロゲンのEE2は経口避妊薬等に用いられる。薬剤としての使用量は国、地域によって傾向が異なることから、その水域への影響にも違いが生じる可能性がある。Johnsonら²⁵⁾は、日本と英国で下水に関する条件を比較し、EE2が英国の下水処理水では1ng/L弱程度検出されるのに対し、日本では検出限界以下であることを見出し、これは経口避妊薬の使用量の違いによるものであるとしている。なお、英国の下水処理水放流先河川で雄のローチ (コイ科の淡水魚) に精巣卵がよく見られるのに対し、日本では魚類の精巣卵は一般的ではないことの一因がEE2の排出であることが強く疑われるものの、この報告²⁵⁾では野生魚の感受性の違い等に起因していると考えている。

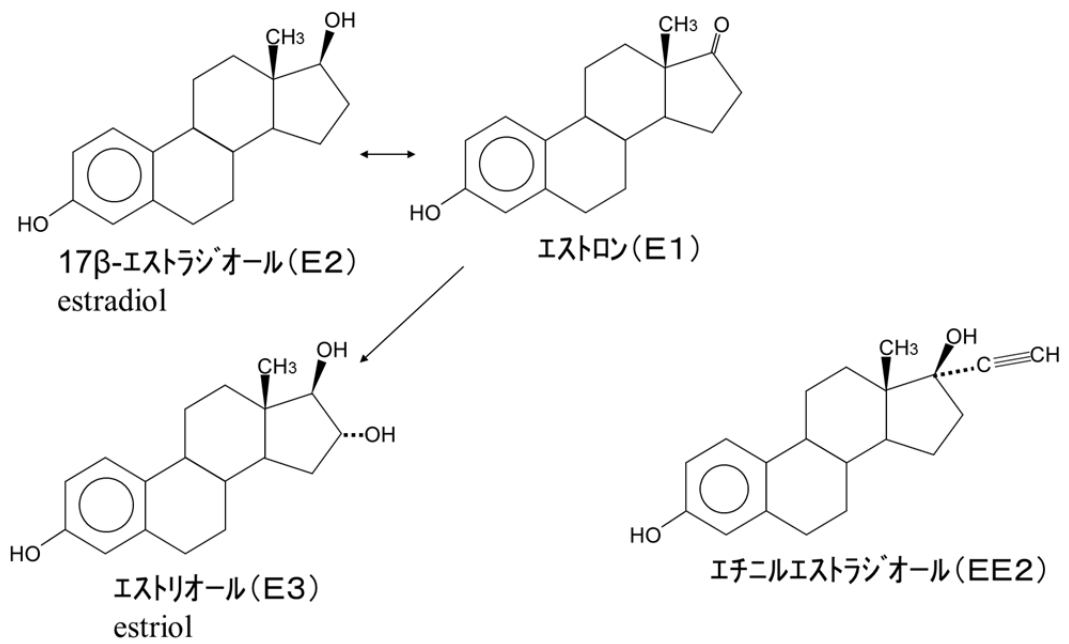


図 1.2 主なエストロゲン、合成エストロゲンの構造

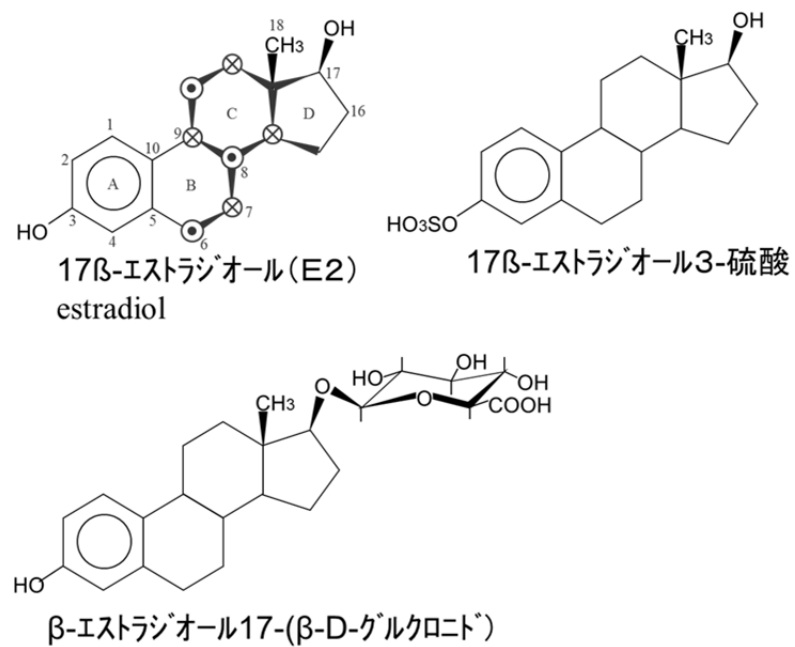


図 1.3 女性ホルモン (E2) とその抱合体の例

表 1.1 エストロゲンの物性値とエストロゲン様活性の例²⁰⁾²¹⁾より作成

Compound	Molecular Weight	Water solubility (mg/L at 20 °C)	Vapor pressure (mmHg)	Log Kow	Log Kd	Relative estrogenic activity	比活性値*
Estrone (E1)	270.4	13	2.3×10^{-10}	3.43	2.44-2.72	2.54	0.3
17 β -Estradiol (E2)	272.4	13	2.3×10^{-10}	3.94	2.68-2.83	100	1
Estriol (E3)	288.4	13	6.7×10^{-15}	2.81	NA	17.6	0.002
β -E2 3-sulfate	352.4	3.6	NA	2.9	NA	0.026	0.00004
β -E2 3- β -D-glucuronide	448.4	347		1.46		0.024	
17 α -Ethinylestradiol (EE2)	296.4	4.8	4.6×10^{-11}	4.15	2.65-2.86	246	0.5

*: 矢古宇ら(1999)、環境工学研究論文集、36、pp.199-208

NA: data not available

上記以外は、Combalbert *et al.* (2010), *App.Microbiol.Biotechnol.*, 86, pp.1671-1692で整理されたTable 1より抜粋

(2) エストロゲンの分析

下水試料中のエストロゲンの検出にあたり、下水試験方法²⁶⁾²⁷⁾では、酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA 法) や液体クロマトグラフ質量分析法 (LC/MS/MS 法) が採用されている。

ELISA 法は、免疫測定法の一種で、生体の免疫反応の原理である抗原抗体反応を利用して対象物質を測定する方法であり、抗原または抗体に結合した酵素による酵素反応を定量化に用いる。E2 の測定では、抗体を利用する抗原抗体反応 (競合反応) 工程と、酵素を利用する発色反応工程により構成され、吸光度を測定する。ELISA 法は操作が比較的簡便であるが、E2 以外の物質とも反応し、測定値が高めの値を示す傾向がある²⁶⁾。

LC/MS/MS 法は、高沸点物質、熱不安定物質、不揮発性物質、高分子物質等の分析に使用される方法である。高速液体クロマトグラフ (HPLC) による分析対象物質の分離と、それに続く質量分析計による分析対象物質の検出により定性定量を行う方法である。対象物質の選択性が高まるが、ELISA 法に比べ操作が煩雑となる²⁶⁾。

エストロゲン抱合体の分析については、下水二次処理水を対象とした LC/MS/MS 法が報告されている²⁸⁾²⁹⁾。

なお、有機物が多く含まれる下水汚泥試料を対象とした微量のエストロゲンの分析方法については検討が十分進んでいるとは言い難い状況にある。

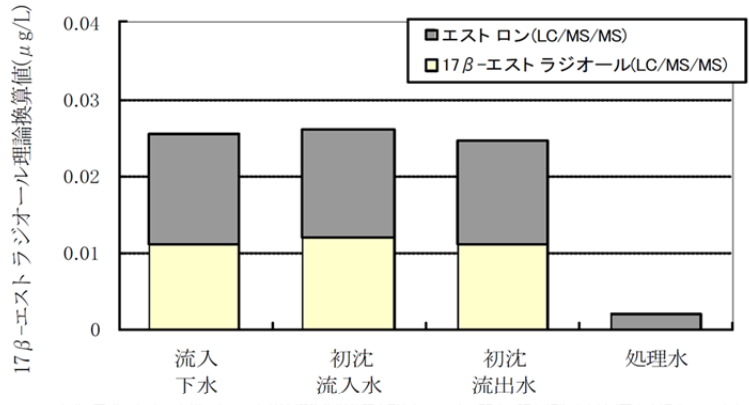
(3) エストロゲンの下水処理過程での挙動等

国土交通省の2000年度（平成12年度）の調査報告²⁾の結果を図1.4に示す。E1、E2の総量は水処理系において減少していた。下水処理水ではE1の割合が大きくなっており、E2（中央値）は検出下限値以下となっていた。

また、全国60処理場で遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定を行なった調査結果がまとめられ、報告されている（図1.5）²⁸⁾。この報告によると、中央値を基準とした場合、流入下水に比べ二次処理水の方が約76%程度低い値であり、下水処理によってエストロゲン様活性が低減されていた。また流入下水の濃度レベルは概ね30~110ng/Lの間にある試料が多く、この濃度範囲に全体の72%が含まれていたが、二次下水処理水については非常に広い濃度分布をしていたことから、処理方法やその運転条件等により低減率は異なると推測している。また、この報告では、化学分析から得られたE1、E2、ノニルフェノール（NP）の濃度と比活性値（表1.1）から理論活性値を算出し、これらの物質の、下水試料のエストロゲン様活性とを比較している（図1.6）²⁸⁾。その結果、二次処理水中に見られるエストロゲン様活性の主要な寄与物質としてE1が重要であると報告している²⁸⁾。

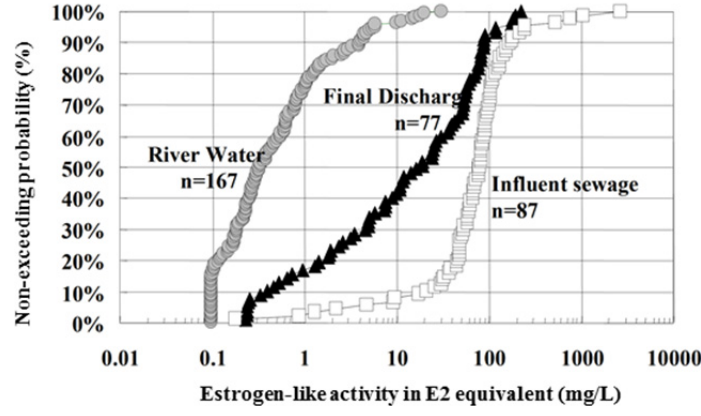
活性汚泥処理プロセスでの運転条件がエストロゲンの除去に及ぼす影響については、活性汚泥パイロットプラントを用いた実験報告がある³⁰⁾。E2についてはSRTが長い方が除去速度は速く、SRTが短い場合にE2およびE1が好気槽で生成される傾向が見られたと報告している³⁰⁾。SRTが短い場合にはE2抱合体からのE2、E1の生成がE2、E1の分解より卓越すると考えており、E2およびE1を生物反応槽の初期段階で速やかに分解する微生物が十分に増殖するために必要なSRTは、それぞれ10日、12.5日程度であるとしている³⁰⁾。

汚泥処理系でのエストロゲンの挙動の報告は少ないが、下水汚泥を農業利用した場合の地下水汚染のおそれが否定できないことから、その重要性が指摘されている²⁰⁾。室内実験や実処理場を対象とした調査で、嫌気性消化過程ではE2、E1等の間での変化はあるものの、エストロゲンの完全分解には至らないと考えられている^{31) 32) 33) 34)}。



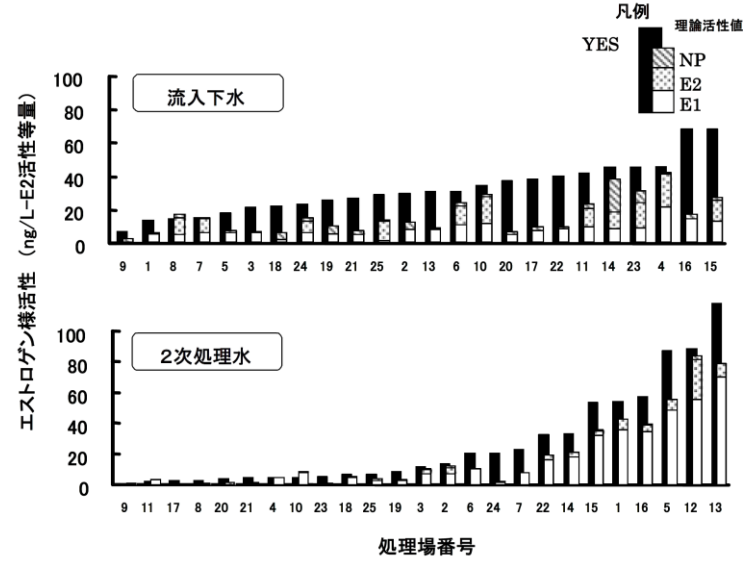
出典：平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）に関する調査報告書（案）（国土交通省、2001年）

図 1.4 水処理系における E1、E2 の挙動（中央値）²⁾



出典：水環境における水質リスク評価に関する研究（土木研究所報告第209号 2008年）

図 1.5 全国の河川水・下水におけるエストロゲン様活性の濃度分布²⁸⁾



出典：水環境における水質リスク評価に関する研究（土木研究所報告第209号 2008年）

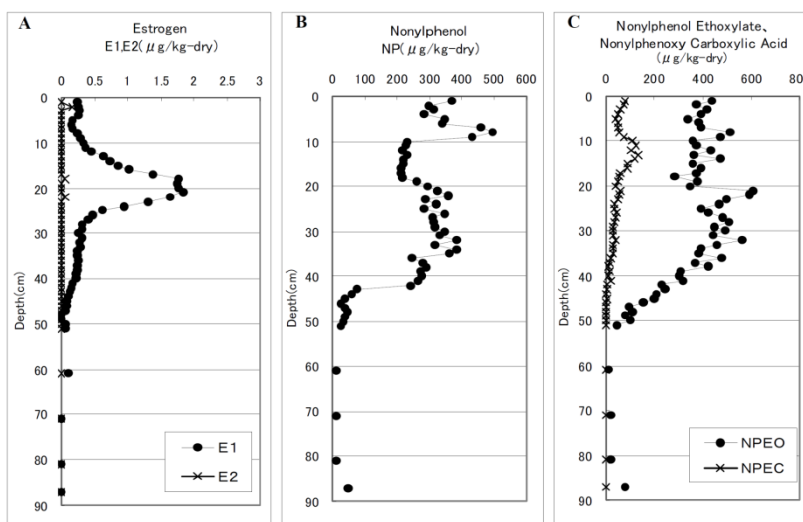
図 1.6 エストロゲン様活性への各物質の寄与²⁸⁾

(4) エストロゲンの水環境での状況等

全国の河川を対象として行われた国土交通省の 2004 年度（平成 16 年度）の調査結果によると、E1 は 68 地点中 18 地点で検出され、そのうち 11 地点で重点調査濃度 ($0.0005\mu\text{g/L}$) を越えていた。E2 は 52 地点中 2 地点で検出され、そのうち 1 地点で重点調査濃度 ($0.0005\mu\text{g/L}$) を越えていた³⁵⁾。この調査では、E1、E2 とも、2000 年度（平成 12 年度）以降、減少傾向は見られていないとしている³⁵⁾。

全国一級河川 94 水系 132 地点を対象に遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定を行なった調査結果が報告されている（図 1.5）²⁸⁾。河川濃度（中央値）は下水処理水濃度（中央値）と比較して二桁低い値となっていた²⁸⁾。また、内分泌かく乱物質の環境中での存在の推移を解明するため、湖沼の底泥の深さごとの内分泌かく乱物質の蓄積状況を報告している（図 1.7）²⁸⁾。E1 の鉛直分布は、1970 年頃に始まった汚染が 1980 年頃から急激に増加し 1990 年頃をピークに減少しており、湖沼流域における 1970 年頃からの人口の急増と、下水処理場や浄化槽を通してのし尿系処理水の増加、またその後の流域下水道整備による下水処理水の湖沼流域外へのバイパスといった流域条件の変化が反映されたものであると考察している²⁸⁾。

下水汚泥リサイクル製品の利用については、微生物、有機および無機の汚染物質によって引き起こされる環境および人体の健康への潜在的なリスクを考慮すべきことが指摘されており、レタスを用いた検討結果が報告されている³⁶⁾。コンポストを施用した砂層で冬期に栽培したレタスの E1 含有量が上昇したが、砂中の土壤微生物叢活性が低かった等によると考えており、下水汚泥リサイクル製品のレタスのホルモンレベルへの影響はわずかで、むしろ再生水の影響が大きいと指摘している³⁶⁾。



出典:水環境における水質リスク評価に関する研究(土木研究所報告第209号 2008年)

図 1.7 湖沼底泥のエストロゲンおよび NP 類の鉛直分布²⁸⁾

1.3.3 ノニルフェノール類

ノニルフェノール (NP) を研究の対象とするにあたり、その関連物質であるノニルフェノールエトキシレート (NPnEO)、ノニルフェノールエトキシカルボン酸 (NPnEC) についての理解も必要であることから、本論文ではこれらをまとめ、ノニルフェノール類 (NP 類) と記述することとする。

(1) ノニルフェノール類の物性等

NP、NPnEO の構造の例を図 1.8 に示す。NP には、ノニル基の分岐や置換位置といった構造の違いから、数多くの異性体がある。水環境中から主に検出され、エストロゲン様活性が強いのは、パラ異性体 (4-NP) の分岐型であるとされている^{37) 38)}。表 1.2 に物性値、毒性値、エストロゲン様活性の例を示す^{21) 39) 40) 41)}。NP は毒性や弱いエストロゲン作用が報告されている。NPnEO のこれらの作用は NP より概ね小さく、エトキシ基 (EO 基) が長いほど小さい傾向にある。

NP の生産量は 6,000 トン (2014 年) と推定されており、主に工業用の界面活性剤として用いられる NPnEO の原料として用いられている³⁷⁾。NPnEO は、主にノニオン系界面活性剤として機械・金属工業、農薬・肥料・飼料工業、繊維工業等で用いられている³⁷⁾。

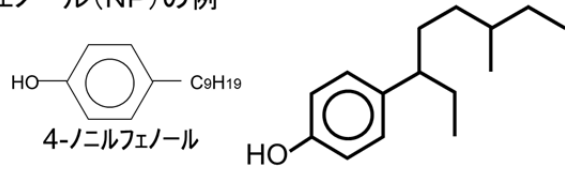
図 1.9 に NPnEO が生分解し NP が生成する経路の概略を参考文献^{42) 43) 44) 45) 46)}をとりまとめて示す。NPnEO のアルキル基が分岐型の場合、一般に微生物分解を受けにくいことから、生分解は EO 基の側から進行する。環境中に放出された NPnEO は、好気性の環境条件下において、微生物の作用等によって段階的に EO 基がはずれ、ノニルフェノールジエトキシレート (NP2EO) やノニルフェノールモノエトキシレート (NP1EO) が生成する。NP2EO や NP1EO は、嫌気的な状況が生じる環境下で NP に分解されると考えられている。

(2) ノニルフェノール類の分析

下水試料中の NP、NPnEO、NPnEC の検出にあたり、下水試験方法^{27) 47)}では、アルキルフェノールの分析にガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS 法)、NPnEO (EO 基数 $n=1\sim 15$)、NPnEC (EO 基数 $n=0\sim 9$) の分析に LC/MS/MS 法が採用されている。また、NPnEO (EO 基数 $n=1\sim 4$ と EO 基数 $n\geq 5$ の分別定量) の分析に HPLC 法、NPnEC (EO 基数 $n=0\sim 2$) の分析には GC/MS 法も用いられてきた^{26) 47)}。

なお、有機物が多く含まれる下水汚泥試料を対象とした微量の NP 類の分析方法については検討が十分進んでいるとは言い難い状況にある。

ノニルフェノール(NP)の例



ノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)の例

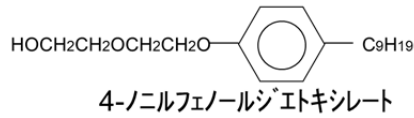


図 1.8 ノニルフェノール類の例

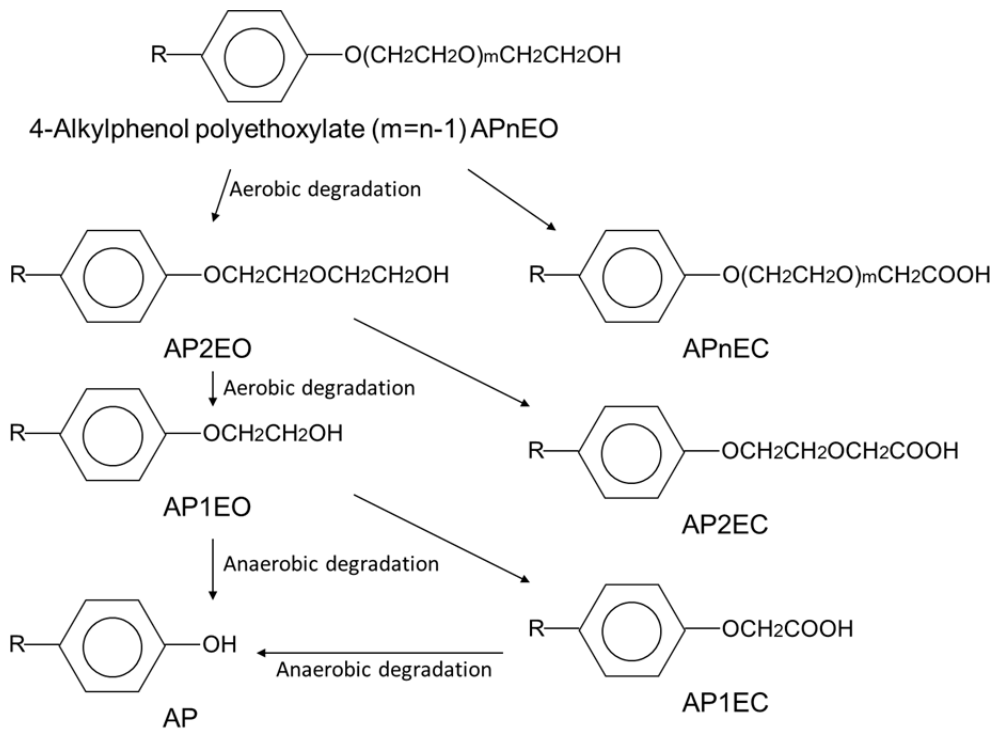


図 1.9 ノニルフェノール類の生物分解経路の概略

AP: Nonylphenol、R: C₉H₁₉ (参考文献^{42) 43) 44) 45) 46)}より作成)

表 1.2 NP、NPnEO、NPnEC の物性値、毒性値、エストロゲン様活性等の例^{21) 39) 40) 41)}より作成

物質	n	Molecular Weight	K _H (Pa/m ³ /mol)	log Kow	4d-LC ₅₀ ^{***} (µg/L)	E2相対活性*	比活性値**
					メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)		
NP	-	220	11.02	4.48	220	0.00021	0.001 (4-NPの場合)
NPnEO	1	264	5.06×10 ⁻²	4.17	3,000	陰性	NA
	2	308	2.91×10 ⁻⁴	4.21	2,500	陰性	
	5	NA	NA	NA	3,600	NA	
	6.4				5,400		
	8.4				11,600		
	8.9				11,200		
	13.1				48,000		
	16.6				110,000		
NPnEC	1	278	5.57×10 ⁻²	1.34	NA	陰性	
	2	322	3.21×10 ⁻⁴	1.34		陰性	

* : 浅野ら(2002)、環境技術、31、pp.811-819

NA: data not available

** : 矢古宇ら(1999)、環境工学研究論文集、36、pp.199-208

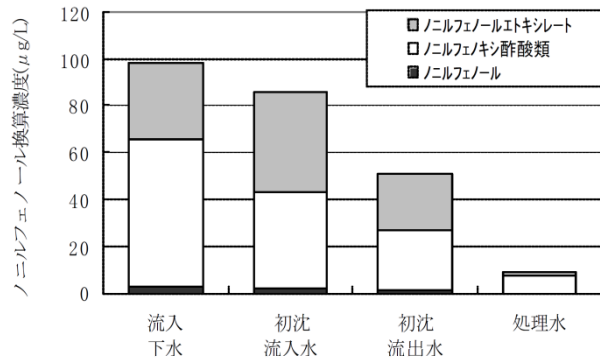
***: 中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会(第3回、平成23年9月30日)資料4で整理された表4より引用
上記以外は、Fenner *et al.* (2002), *Env.Sci.Tech.*, 36(6), pp.1147-1154, Sup.で整理された Table A3より抜粋

(3) ノニルフェノール類の下水処理過程での挙動等

国土交通省の2000年度(平成12年度)の調査報告²⁾の結果を図1.10に示す。NP類の総量は水処理系で約90%削減されていた。また、下水処理水中ではNPnEO、NPnECの濃度が高かった。

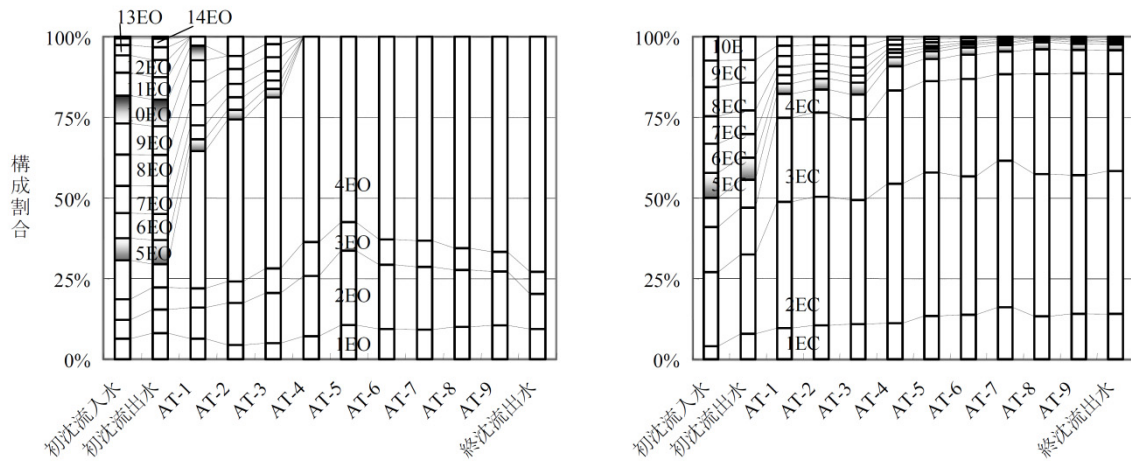
実処理場での溶存態のNP、NPnEO、NPnECの挙動調査²⁸⁾によれば、NP、NPnEOは、曝気槽で初沈流入水、初沈流出水に比べて1/10~1/100程度に濃度が減少し、NPnECは2倍以上に濃度が増加、また、NPnEOやNPnECの構成は、エアレーションタンク以降EO数5以上のものが消失し、終沈流出水の段階でNP1EO~NP4EO、NP1EC~NP4ECで構成されていた(図1.11)としており、NPnEOはエアレーションタンク内で、NPnEOのままEO鎖が短鎖化、またはNPnECに形態を変えると報告している²⁸⁾。また岡安ら⁴⁸⁾は、連続式活性汚泥処理実験装置を用いNPnEOからNPへの生分解性を調査しており、NP2EOやNP1EOからのNPの生成は、十分な好気条件でもなく、完全な嫌気条件でもない、微量の溶存酸素が存在する(微好気)条件、もしくは、微好気と嫌気が繰り返される条件、または微好気条件の中に部分的に嫌気が存在する条件で生じるとしている。

活性汚泥パイロットプラントを用いた実験報告では、NPは活性汚泥に吸着し、その後汚泥とともに引き抜かれているか、もしくは活性汚泥により分解されているものと考えられている³⁰⁾。



出典:平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査報告書(案)(国土交通省, 2001年)

図 1.10 水処理系における NP 類の挙動 (中央値)²⁾



出典:水環境における水質リスク評価に関する研究(土木研究所報告第209号 2008年)

図 1.11 水処理系での NPnEO、NPnEC の EO 数毎の分布の変化²⁸⁾

(4) ノニルフェノールを対象とした環境基準

2012年8月に生活環境の保全に関する環境基準として、公共用水域における水生生物及びその生息又は生育環境を保全する観点からNPを追加するとともに、これについて基準値が設定された(平成24年8月22日、環境省告示第127号)。水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について(平成24年8月22日、環水大発第120822001号)⁴⁹⁾では「我が国における当該物質の生産・使用状況、公共用水域等における検出状況等を踏まえて、環境基準として設定したものである。基準値は、水生生物の集団の維持を可能とする観点から、基本的には慢性影響を防止する上で必要な水質の水準を定めるものである。このためノニルフェノールの濃度の年間平均値として基準値を定めたものである。また、海域及び淡水域の区分、水域の水温、産卵・繁殖又は幼稚仔の生育場等の水生生物の生息状況の適応性に応じて6種類の類型に分けて設定した。」としている。水域類型及び基準値の概要を引用し表1.3に示す⁴⁹⁾。

環境省では、NPに関する排水規制の必要性等についても検討している。2017年度末時点で中央

環境審議会水環境部会排水規制等専門委員会は、環境基準の設定以降、全国的な超過の事例がみられていないことなどから、「現時点においては、全国一律的な対策として、工場・事業場を対象とする水質汚濁防止法の一貫排水基準を新たに設定する必要性は低い」という考えを示しており、引き続き、同専門委員会において動向等を注視していくこととされている⁵⁰⁾。

「水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について（第1次答申）」（平成24年3月7日、中環審第647号）⁵¹⁾では、「内分泌かく乱作用を介した水生生物への影響については、現在、試験法の開発が進められているところであり、評価の手法に関しては確立されていない状況にある。このため、今回のノニルフェノールに係る水質目標値の設定については内分泌かく乱作用についての評価は行っていない。ただし、今後、科学的知見の集積が進み、内分泌かく乱作用についての評価が可能となった時点において、水質目標値の見直しの必要性を検討していくことが必要である。」とされている。また、「ノニルフェノールについては、環境中でノニルフェノールエトキシレートの生物分解により生成するものもあることから、今後の環境管理施策の検討にあたってはこれを十分考慮した上で行う必要がある。」⁵¹⁾とも指摘されている。

表 1.3 生活環境の保全に関する環境基準（ノニルフェノール）⁴⁹⁾

河川及び湖沼

項目 類型	水生生物の生息状況の適応性	基準値	該当水域
		ノニルフェノール	
生物 A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	0.001mg/L 以下	第1の2の(2)により水域類型ごとに指定する水域
生物特 A	生物 A の水域のうち、生物 A の欄に掲げる水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	0.0006mg/L 以下	
生物 B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域	0.002mg/L 以下	
生物特 B	生物 A 又は生物 B の水域のうち、生物 B の欄に掲げる水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	0.002mg/L 以下	

備考 基準値は年間平均値とする。

海域

項目 類型	水生生物の生息状況の適応性	基準値	該当水域
		ノニルフェノール	
生物 A	水生生物の生息する水域	0.001mg/L 以下	第1の2の(2)により水域類型ごとに指定する水域
生物特 A	生物 A の水域のうち、水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚仔の生育場として特に保全が必要な水域	0.0007mg/L 以下	

備考 基準値は年間平均値とする。

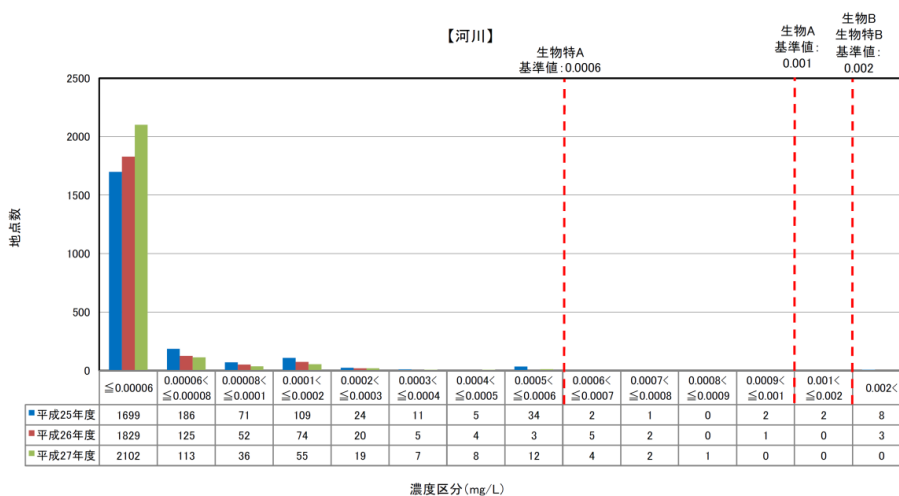
出典：環水大発第120822001号（環境省水・大気環境局長、平成24年8月22日）

NP 類をはじめとするアルキルフェノールエトキシレートとその代謝物は、神経系⁵²⁾および免疫系の発達に影響を与える可能性が指摘されているが⁵³⁾⁵⁴⁾、ヒトの健康リスクの面も含め、疫学データの欠如、複数の暴露源、環境中での残留性、さらに NP 類はそれぞれが異性体の複雑な混合物である一方で異性体ごとに生物影響が異なる可能性がある等、課題が多く、十分な知見が得られていない状況にあり、使用規制までを含めた研究を今後も進める必要があると指摘されている⁵⁵⁾。

以上のとおり、NP 類を対象とした環境基準は設定されたが、検討すべき点が多く残されている状況にある。

(5) ノニルフェノール類の水環境での状況

全国の河川を対象として行われた国土交通省の 2004 年度（平成 16 年度）の調査結果によると、NP は 66 地点中 6 地点で検出され、うち 1 地点で重点調査濃度（0.304 μ g/L）を越えていた³⁵⁾。内分泌かく乱物質が環境に与える影響を、過去からの推移として調べるため、湖沼の底泥の深さごとの内分泌かく乱物質の蓄積状況が測定されている（図 1.7）²⁸⁾。工業用洗剤に由来する NP 類は、1970 年頃から高い濃度となっており、近年でも減少の傾向が見られないことから、下水道に取り込まれない排水に由来する可能性が考えられるとしている²⁸⁾。その後、NP が水生生物保全環境基準に設定されて以降、各都道府県において水質汚濁防止法に基づく公共用水域での常時監視調査が行われており、全水域において環境基準を達成している（図 1.12）³⁷⁾。水環境中で検出される NP には、NP が直接排出されたものと、NPnEO として排出されたものが、分解過程を経て生成したものとがある。産業界での NPnEO の代替品への転換方針もあり³⁷⁾、NP の水環境中での検出は減少傾向にあると考えられている⁵⁰⁾。



出典：第24回中央環境審議会排水規制等専門委員会 参考資料4（2017年）

図 1.12 公共用水域（河川）における NP の調査地点数及び検出濃度の分布³⁷⁾

1.4 本研究の構成

本研究の構成を表 1.4 に示す。

ここまで、生物の内分泌作用をかく乱し生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると思われる物質等（内分泌かく乱物質）のうち、エストロゲンとノニルフェノール類（NP 類）に着目して知見を整理した。エストロゲンと NP 類の下水処理場内での挙動については、主に水処理系に注目した研究は進んでいるものの、汚泥処理系での挙動に関する知見は少ない。これは、内分泌作用のかく乱が懸念されている対象が主に水環境中の生物やその生態系であり、人間社会から水環境に至る主要な負荷が下水処理水であることに加え、有機物が多く含まれる下水汚泥試料中の微量有機物の分析が技術的に困難であることによると考えられる。内分泌かく乱物質については、十分な知見が得られておらず、今後も検討を進めていく必要性が指摘されており⁵¹⁾⁵⁵⁾、下水処理場全体としてのこれらの物質の挙動や、下水汚泥の排出先での挙動に関する知見を深めることは、環境全体の中での下水道システムの役割を理解するうえでも必要である。ここで、エストロゲンについては、汚泥処理系の嫌気環境下での分解が期待できないとされている一方で、NP 類については NP とその前駆物質の挙動に関する知見が少ない。また、下水汚泥リサイクル製品の施用先でのこれらの物質の挙動についても知見が少ない。

以上を踏まえ、本研究では、下水汚泥試料中の NP 類の分析手法の提案（第 2 章）、下水汚泥処理系における NP 類の挙動の解明（第 3 章）、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動の解明（第 4 章）を目的とした。

表 1.4 本研究の構成

			物性等	下水処理場				環境等
				分析	実態	挙動	対策	
ノニルフェノール類	NP	水系	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)
		汚泥系		2章	—	3章	—	4章
	NPnEO	水系		(1章)	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)
		汚泥系		2章	—	3章	—	4章
	NPnEC	水系		(1章)	(1章)	(1章)	—	—
		汚泥系		(2章)	—	3章	—	—
エストロゲン様物質	E2等	水系	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)	(1章)	
		汚泥系	—	—	(1章)	—	4章	

第 1 章参考文献

- 1) 建設省河川局、建設省都市局下水道部 (1999) : 平成 10 年度 水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果.
- 2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部 (2001) : 平成 12 年度 下水道における内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) に関する調査報告書 (案) .
- 3) 日本下水道協会 (2018) : 平成 29 年度下水道白書 日本の下水道、pp.118-130、資料編 p.7 及び pp.17-19、(公社) 日本下水道協会.
- 4) 平成 28 年度水循環施策 (平成 29 年版水循環白書) (2017)、p.18、第 193 回国会 (常会) 提出.
- 5) 国土交通省都市・地域整備局下水道部流域管理官付 (2010) : 下水道に係る水系水質リスクへの対応方策 (案)、本編 pp.1-11、国土交通省都市・地域整備局下水道部流域管理官付.
- 6) 下水道政策研究委員会 (2014) : 新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～、pp.4-99～4-105、国土交通省水管理・国土保全局下水道部、(公社) 日本下水道協会.
- 7) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所下水道研究部 (2015) : 下水道技術ビジョン、国土交通省水管理・国土保全局下水道部、国土交通省国土技術政策総合研究所下水道研究部.
- 8) 佐藤和明、南山瑞彦、大竹久夫、常田聡 (2016) : 下水道に集約されるリン資源量の最近の動向、再生と利用、40(152)、pp.70-73.
- 9) 国土交通省都市・地域整備局下水道部 (2010) : 下水道におけるリン資源化の手引き、p.11、国土交通省都市・地域整備局下水道部.
- 10) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部 (2018) : 資源・エネルギー循環の形成、http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/crd_sewerage_tk_000124.html (2018 年 11 月閲覧) .
- 11) 下水道法令研究会 (2016) : 逐条解説 下水道法 第四次改定版、pp.304-318、(株) ぎょうせい.
- 12) 農林水産省 (2015) : 汚泥肥料中の重金属管理手引書、改訂第 1 版、農林水産省.
- 13) Zhang,Z., Le Velly,M., Rhind,S.M., Kyle,C.E., Hough,R.L., Duff,E.I. and McKenzie,C. (2015) : A study on temporal trends and estimates of fate of Bisphenol A in agricultural soils after sewage sludge amendment, *Science of The Total Environment*, 515-516, pp.1-11.
- 14) Colborn,T., Dumanoski,D. and Myers,J.P. (1996) : Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? - A Scientific Detective Story, Dutton.
- 15) Routledge,E.J., Sheahan,D., Desbrow,C., Brighty,G.C., Waldock,M. and Sumpter,J.P. (1998) : Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach, *Environmental Science and Technology*, 32(11), pp.1559-1565.
- 16) Blackburn,M.A. and Waldock,M.J. (1995) : Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales, *Water Research*, 29(7), pp.1623-1629.

- 17) Jobling,S., Nolan,M., Tyler,C.R., Brighty,G. and Sumpter,J.P. (1998) : Widespread Sexual Disruption in Wild Fish, *Environmental Science and Technology*, 32(17), pp.2498–2506.
- 18) 環境省 (2016) : 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2016—、環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課.
- 19) 加藤順三、小野内常子 (1975) : エストロゲン、ホルモンと臨床 増刊号 Vol.23、pp.196-205.
- 20) Combalbert,S. and Hernandez-Raquet,G. (2010) : Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), pp.1671–1692.
- 21) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明 (1999) : 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定、環境工学研究論文集、36、pp.199-208.
- 22) Balaguer,P., François,F., Comunale,F., Fenet,H., Boussioux,A.-M., Pons,M., Nicolas,J.-C. and Casellas,C. (1999) : Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens, *Science of The Total Environment*, 233(1-3), pp.47-56.
- 23) Routledge,E.J. and Sumpter,J.P. (1996) : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), pp.241-248.
- 24) Leusch,F.D.L., de Jager,C., Levi,Y., Lim,R., Puijker,L., Sacher,F., Tremblay,L.A., Wilson,V.S. and Chapman,H.F. (2010) : Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters, *Environmental Science and Technology*, 44(10), pp.3853-3860.
- 25) Johnson,A., Tanaka,H., Okayasu,Y. and Suzuki,Y. (2007) : Estrogen Content and Relative Performance of Japanese and British Sewage Treatment Plants and their Potential Impact on Endocrine Disruption, *Environmental Sciences*, 14(6) pp.319-329.
- 26) 日本下水道協会 (2002) : 下水試験方法 (追補暫定版) —内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編—2002年版、(社) 日本下水道協会.
- 27) 日本下水道協会 (2012) : 下水試験方法—2012年版—上巻、(公社) 日本下水道協会.
- 28) 土木研究所 (2008) : 水環境における水質リスク評価に関する研究、土木研究所報告、209、pp.55-122、(独) 土木研究所.
- 29) Komori,K., Tanaka,H., Okayasu,Y., Yasojima,M. and Sato,C. (2004) : Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, *Water Science and Technology*, 50(5), pp.93-100.
- 30) 斎野秀幸、山縣弘樹、中島英一郎、重村浩之、鈴木穰 (2004) : SRT 制御による下水中内分泌かく乱物質の除去、水環境学会誌、27(1), pp.61-67.
- 31) Ternes,T.A., Andersen,H., Gilberg,D. and Bonerz,M. (2002) : Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS, *Analytical Chemistry*, 74(14), pp.3498–3504.

- 32) Andersen,H., Siegrist,H., Halling-Sørensen,B. and Ternes,T.A. (2003) : Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant, *Environmental Science and Technology*, 37(18), pp.4021–4026.
- 33) Czajka,C.P. and Londry,K.L. (2006) : Anaerobic biotransformation of estrogens, *Science of The Total Environment*, 367(2–3), pp.932-941.
- 34) de Mes,T.Z.D., Kujawa-Roeleveld,K., Zeeman,G. and Lettinga,G. (2008) : Anaerobic biodegradation of estrogens – hard to digest, *Water Science and Technology*, 57(8), pp.1177-1182.
- 35) 国土交通省河川局河川環境課 (2005) : 平成 16 年度全国一級河川における微量化学物質に関する事態調査の結果について (ダイオキシン類、内分泌攪乱物質) .
- 36) Shargil,D., Gerstl,Z., Fine,P., Nitsan,I. and Kurtzman,D. (2015) : Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants, *Science of The Total Environment*, 505, pp.357-366.
- 37) 中央環境審議会水環境部会排水規制等専門委員会 (2017): ノニルフェノール及びノニルフェノールエトキシレートに関する参考資料、第 24 回中央環境審議会水環境部会排水規制等専門委員会、平成 29 年 12 月 25 日、参考資料 4.
- 38) Lu,Z. and Gan,J. (2014) : Analysis, toxicity, occurrence and biodegradation of nonylphenol isomers: A review, *Environment International*, 73, pp.334-345.
- 39) Fenner,K., Kooijman,C., Scheringer,M. and Hungerbühler,K. (2002) : Including Transformation Products into the Risk Assessment for Chemicals: The Case of Nonylphenol Ethoxylate Usage in Switzerland, *Environmental Science and Technology*, 36(6), pp.1147–1154, Supplementary Information.
- 40) 中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会 (2011): ノニルフェノールエトキシレートについて、第 3 回中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会、平成 23 年 9 月 30 日、資料 4.
- 41) 浅野昌弘、阪口祐二、池道彦、角井伸次、田中稔、藤田正憲 (2002) : 酵母 Two-hybrid 法によるノニルフェノールポリエトキシレート代謝産物の内分泌攪乱性の評価、環境技術、31(10)、pp.811-819.
- 42) Ahel,M., Giger,W. and Koch,M. (1994) : Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment - I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment, *Water Research*, 28, pp.1131-1142.
- 43) Giger,W., Brunner,P.H. and Schaffner,C. (1984) : 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science*, 225(4662), pp.623-625.
- 44) Talmage,S.S. (1994) : Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates, pp.253-255, Lewis publishers.

- 45) Manzano,M.A., Perales,J.A., Sales,D. and Quiroga,J.M. (1998) : Effect of Concentration on the Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate in River Water, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4), pp 489–496.
- 46) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課 (2004) : 平成 15 年度内分泌攪乱化学物質における暴露経路調査結果について、pp.1-33、平成 16 年度第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会、平成 16 年 12 月 24 日、資料 2-3.
- 47) 小森行也、南山瑞彦 (2012) : NP、4-t-OP とその関連物の分析方法、下水道協会誌、49(600)、pp.59-64.
- 48) 岡安祐司、小森行也、鈴木穰、田中宏明、八十島誠 (2005) : 活性汚泥処理における、ノニルフェノールエトキシレートからのノニルフェノールの生成、水環境学会誌、28(11)、pp.671-676.
- 49) 環境省水・大気環境局長、水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について、平成 24 年 8 月 22 日、環水大水発第 120822001 号.
- 50) 中央環境審議会水環境部会排水規制等専門委員会 (2017) : ノニルフェノール及びノニルフェノールエトキシレートに係る排水対策について (案)、第 24 回中央環境審議会水環境部会排水規制等専門委員会、平成 29 年 12 月 25 日、資料 5.
- 51) 中央環境審議会、水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について (第 1 次答申)、平成 24 年 3 月 7 日、中環審第 647 号.
- 52) Kazemi,S., Khalili-Fomeshi,M., Akbari,A., Kani,S.N.M., Ahmadian,S.R. and Ghasemi-Kasman,M. (2018) : The correlation between nonylphenol concentration in brain regions and resulting behavioral impairments, *Brain Research Bulletin*, 139, pp.190-196.
- 53) Raecker,T., Thiele,B., Boehme,R.M. and Guenther,K. (2011) : Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies, *Chemosphere*, 82(11), pp.1533-1540.
- 54) Noorimotlagh,Z., Mirzaee,S.A., Ahmadi,M., Jaafarzadeh,N. and Rahim,F. (2018) : The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, pp.171-181.
- 55) Acir,I.-H. and Guenther,K. (2018) : Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates - A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation, *Science of The Total Environment*, 635, pp.1530-1546.

第2章 下水汚泥試料中のノニルフェノール類の分析手法

2.1 はじめに

多量の有機物を含む泥状試料を対象とした内分泌かく乱物質（生物の内分泌作用をかく乱し生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると思われる物質等）の分析方法は十分には確立されておらず、下水汚泥の内分泌かく乱物質含有量の把握のため、抽出効率が高く、安定した分析結果を得ることができる分析手法の開発が必要である。

1998年度（平成10年度）の建設省の実態調査¹⁾において高頻度でその存在が確認されたノニルフェノール（NP）とノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）を分析対象物質とした検討が先行研究として行われた²⁾。以下に、その概略を示す。

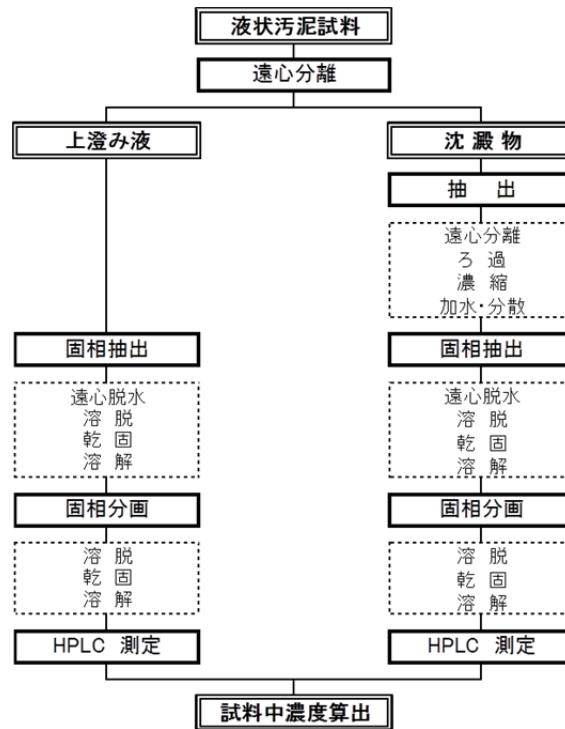
NP及びNPnEOの分析は、既存の分析マニュアル³⁾⁴⁾を参考としつつ、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法を用いる小森らの方法⁵⁾に主に基づいて行われた。一般的な分析フローの概略を図2.1に示す。

汚泥処理系における調査試料は液状から固形状までの高含水のものが大部分を占める。このために、試料中の固形物に作用する抽出溶媒の含水率が抽出効率におよぼす影響を確認する必要がある。そこで、検体の含水率の違いを想定し、精製水によりメタノールを100～65%に調整したものを抽出溶媒として用い、抽出時間を1～6時間として、メタノール濃度（水分量）が分析値に与える影響を比較した。

本検討で用いた供試汚泥は余剰活性汚泥である。1mm篩を通過させた後風乾し0.84mm以下に粉碎したものである。汚泥からの分析対象物質の抽出には振とう抽出法を用いた。検出にはHPLC（蛍光検出器）を用いた。なお、NPnEOはエトキシレート基が1～4のもの（ $n \leq 4$ ）と5以上のもの（ $n \geq 5$ ）に分けて測定した。

分析結果からは、抽出時間、メタノール濃度が抽出効率におよぼす影響に、規則性は見られなかった。しかしながら、用いた試料性状が均一であることと抽出時間を十分に取ったケースもあることを考慮すると、この結果については抽出操作によるものとは考えにくく、抽出工程以降の分析工程が分析結果に影響していると考えられた。その原因として、抽出液のクリーンアップのために行う固相抽出工程が複雑な操作を必要としていることから、この工程に問題があると考えられた。

以上を踏まえ、固相抽出工程を省いて分析を行ったところ、固相抽出工程を組み込んだ測定結果と比べて汚泥からの抽出時間やメタノール濃度の影響が明瞭にうかがえる結果が得られた。さらに、固相抽出工程を省くことで検出濃度そのものが高くなったことから、クリーンアップのための固相抽出工程を省くことにより回収率が高くなっているものと考えられた。



出典：平成11年度下水道関係調査研究年次報告書集(土木研究所資料第3755号 2000年10月)

図 2.1 NP 及び NPnEO の分析フロー概略²⁾

夾雑物の多い汚泥試料の分析にあたり、クリーンアップは一般的には必須であると考えられるが、これらのことから、分析対象とする汚泥によっては操作が複雑な固相抽出工程を省くことがむしろ有効である場合があることが明らかとなるとともに、汚泥中の内分泌かく乱物質の分析について検討すべき点が多く残されていることが明らかとなった。

汚泥処理系での内分泌かく乱物質の消長を把握する上で、NPnEO、ノニルフェノールエトキシカルボン酸 (NPnEC) 等を含めた NP 類の分析手法を確立する必要がある一方で、以上に示した先行研究²⁾のように、多量の有機物を含む下水汚泥試料を対象とした内分泌かく乱物質の分析手法は確立されていない。そこで下水汚泥試料中の内分泌かく乱物質含有量の把握のため、抽出効率が高く、安定した分析結果を得ることができる分析手法の開発が必要である。本研究では、下水汚泥試料中の NP、NPnEO の分析のための抽出方法を検討するとともに、下水汚泥試料中 NPnEC の分析を試みた。

2.2 下水汚泥試料中のノニルフェノール、ノニルフェノールエトキシレートの抽出方法

2.2.1 検討内容

下水汚泥試料からの目的物質の抽出については十分な検討が進んでいるとはいいがたい状況にあり、より高い回収率で安定した結果が得られる抽出手法、抽出条件の開発が必要である。本研究では主に高速溶媒抽出法（Pressurized Fluid Extraction、以下、PFE法）⁶⁾を下水汚泥試料からのNP、NPnEOの抽出に応用することを試みた。

PFE法とは、土壌、汚泥等から難水溶性の化学物質を抽出する方法であり、ソックスレー抽出法と同等の回収率を少量の溶媒で高速に達成するため、高温（100～180℃）、高圧（10.3～13.8MPa（1500～2000psi））の条件下で抽出を行うものである⁶⁾。写真2.1に検討に用いた装置の外観を示す。PFE法は米国環境保護庁の試験方法として検討されていた方法であるが⁶⁾、下水汚泥試料中のNP、NPnEOを対象とした抽出条件が明らかではないため、抽出条件を検討することとした。

また、超臨界流体抽出法（Supercritical Fluid Extraction、以下、SFE法）による抽出も試みた。SFE法とは、超臨界状態（表2.1）の流体を用いて目的物質を抽出する方法で、高温高圧下で液体とも気体とも異なる抽出効果が得られる可能性がある。さらに、少量の添加溶媒により、抽出効率が大きく変わることから、効果的な抽出を行いつつ、抽出のための有機溶媒を削減することが期待できる。添加溶媒を極少量にすることができれば、抽出操作後に抽出溶媒を取り除く過程を容易に行えるようにすることも期待できる。SFE法については、近年、他のより汎用的な抽出手法に研究の対象が移っているとされているものの⁷⁾、興味深い現象として多くの研究が行われており、汚泥からのNP類の抽出条件の検討も行われている⁸⁾⁹⁾。Linら⁸⁾はメタノールを添加した超臨界状態の二酸化炭素を用いて4-NPを、また、Leeら⁹⁾は水-ジクロロメタンを添加溶媒として用いてNPnEO等も抽出の対象として検討しており、ソックスレー抽出法より高い回収率を得ている。そのため、下水汚泥を対象としたNP類の挙動を把握するうえで適切な分析用抽出技術である可能性がある。ただし、これらの検討は添加回収実験という性質上、多量の有機物を含む下水汚泥内からの微量物質の分析のための抽出とは現象が異なっており、抽出効率に関する知見も十分とは言えない。この点に関してはLinら⁸⁾も同様の問題を指摘しており、さらなる抽出条件の検討が必要であると考えられる。

写真2.2に検討に用いた装置の外観を示す。本研究では、超臨界状態の二酸化炭素を用いた抽出を試み、添加溶媒の有無による抽出量の違いを検討することとした。



写真 2.1 高速溶媒抽出（Pressurized Fluid Extraction）装置

表 2.1 臨界温度、臨界圧力の例 ¹⁰⁾より作成

	臨界温度	臨界圧力
二酸化炭素	304.2 K (約31°C)	7.37 MPa (約73atm)
メタノール	512.6 K (約239°C)	8.09 MPa (約80atm)
水	647.3 K (約374°C)	22.04 MPa (約218atm)

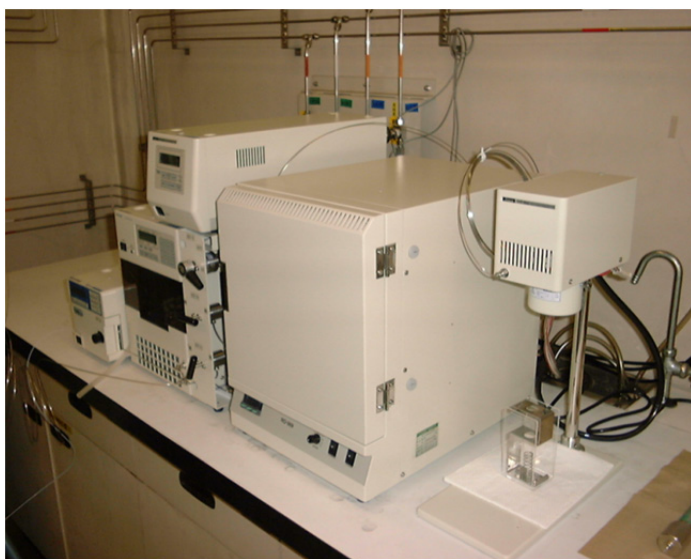


写真 2.2 超臨界流体抽出（Supercritical Fluid Extraction）装置

2.2.2 検討方法と結果

(1) PFE法における抽出溶媒

PFE法によるNP、NPnEOの抽出の検討にあたり、抽出溶媒の違いが回収量におよぼす影響について検討した。使用した溶媒はメタノール、アセトン、ヘキサン、アセトニトリル、アセトン：ジクロロメタン（1：1）、酢酸エチルである。抽出のための静置は、10分静置して試料と溶媒を接触させた後、抽出溶媒を入れ替え再び10分静置するという設定とした。使用したPFE装置はASE-200（Dionex社）である。圧力は13.8MPa（2000psi）、温度は100℃とした。

抽出後の操作は、既存の分析マニュアル³⁾⁴⁾を参考とし、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法を用いる小森らの方法⁵⁾に主に基づいて行った。使用したHPLCはWaters 2690（蛍光検出器：Waters 474（Ex225nm、Em300nm）、カラム：GLサイエンス社 Inertsil Ph 5μm、φ4.6×150mm）である。また、抽出液の分析は固相抽出操作を除いて行った。

これらの試験には、実下水処理場から得られた余剰活性汚泥を1mm篩を通過させた後風乾し、0.84mm以下に粉碎したものをを用いた。

この検討では、多量の有機物を含む下水汚泥内からの微量物質の分析のための抽出を対象としていることから、対象物質の添加を行う添加回収率ではなく、対象物質の添加は行わず、実試料から可能な限り多くの分析対象物質を抽出した量という観点で評価することとした。

結果を表2.2に示す。メタノールを抽出溶媒とした場合のNP、NPnEOの抽出量が他の抽出溶媒での抽出量よりも多かった。また、変動係数も他の溶媒と比べて小さくなる傾向があった。この結果にしたがい、PFE法によるNP、NPnEOの分析にあたり、抽出溶媒としてメタノールを用いることとした。

表 2.2 余剰活性汚泥からのNP、NPnEO回収量におよぼす抽出溶媒の影響

使用溶媒		メタノール	アセトン	nヘキサン	アセトニトリル	アセトン：ジクロロメタン(1:1)	酢酸エチル
NP	平均抽出量 [μg/g-dry]	20.2	17.0	13.3	13.0	17.5	12.1
	変動係数 [%]	2.3	5.3	4.0	7.0	4.2	8.8
NPnEO (n≤4)	平均抽出量 [μg/g-dry]	43.6	31.5	28.3	28.6	34.4	22.0
	変動係数 [%]	2.3	7.3	3.3	6.9	5.8	8.1
NPnEO (n≥5)	平均抽出量 [μg/g-dry]	44.3	31.5	16.7	24.1	27.1	28.7
	変動係数 [%]	3.2	12.2	7.7	6.4	3.1	6.7

(2) 抽出のための操作条件

PFE 法、SFE 法を用い、乾燥汚泥やコンポスト中の NP 類を効率良く抽出するための操作条件の検討を行った。

この検討でも NP、NPnEO の添加は行わず、実試料から可能な限り多くの分析対象物質を抽出した量との観点で抽出効率を評価することとした。

PFE 法については、抽出圧力を一定とし (13.8MPa (2000psi))、抽出時間を 5~30 分、抽出温度を 40~100℃に設定して分析を行った。使用した PFE 装置は ASE-200 (Dionex 社) である。

SFE 法による抽出に関しては、抽出圧力 20MPa、抽出温度 60℃で、メタノールの添加の有無が NP、NPnEO の回収量に与える影響を確認した。使用した SFE 装置は SCF-Get (日本分光(株)) である。二酸化炭素流量は 3mL-liq/min、メタノールを添加する場合のメタノール流量は 0.2mL/min とした。抽出時間は、二酸化炭素のみの場合は 60 分、メタノールを添加した場合は、装置の操作上の限界があり 30 分とした。

比較対象とした抽出方法は、既存の方法で用いられている加熱還流法¹¹⁾である。抽出溶媒はメタノール、抽出時間は 1 時間に加え、さらに抽出溶媒を新たなものに変えて 1 時間行った。

抽出後の操作は、既存の分析マニュアル³⁾⁴⁾を参考とし、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いる小森らの方法⁹⁾に主に基づいて行った。使用した HPLC は Waters 2690 (蛍光検出器:Waters 474 (Ex225nm、Em300nm)、カラム:GLサイエンス社 Inertsil Ph 5μm, φ4.6×150mm) である。また、抽出液の分析は固相抽出操作を除いて行った。

分析対象試料には、実下水処理場から得られた余剰活性汚泥、コンポストを 1mm 篩を通過させた後風乾し、0.84mm 以下に粉碎したものをを用いた。

PFE 法に関する結果を図 2.2 に示す。図中の点は各分析値、線はそれぞれの平均値を結んでいる。余剰活性汚泥を対象とした抽出では、概ね抽出温度が高く、抽出時間が長いほど抽出量が多くなる傾向があり、抽出温度が高くなるにつれその差が縮小する傾向にあった。コンポストを対象とした抽出では、抽出時間、抽出温度での安定した増減の傾向が見られず、概ね抽出温度、抽出時間によらず一定である傾向が見られた。これは、コンポスト試料が汚泥処理系のコンポスト過程で処理されたことにより、余剰活性汚泥よりも抽出が容易な状態にまで分解が進んでいたためと考えられる。

加熱還流法による抽出によって得られた結果と、PFE 法の結果のうち抽出時間 10 分、抽出温度 60、100℃での結果とを比較し図 2.3 に示す。図中の点は個別の分析値 (繰り返し回数各 3~6 回)、棒グラフは平均値をあらわしている。PFE 法での余剰活性汚泥からの抽出量については、NP では PFE 法と加熱還流法の間で抽出量に大きな差は無かった。NPnEO では、PFE 法による抽出の方が加熱還流法による抽出より抽出量が多かった。PFE

法は加熱還流法に比べ、抽出時間が 1/4 以下で、1.03~1.3 倍の NP 類を抽出することが可能であった。コンポストからの抽出量については、NPnEO($n \leq 4$)で加熱還流法の抽出量が多かった。NP、NPnEO($n \geq 5$)では概ね同程度の抽出量となった。データのばらつきについては、加熱還流法については分析操作者の慣れの問題もあるが、概ね PFE 法でのばらつきが小さい結果となった。

農業用土壌を対象に PFE 法でオクチルフェノール（アルキルフェノールの一種）を抽出した場合、70℃以上では分解するとの報告もあるが¹²⁾、ここではそのような傾向は見られなかった。この原因解明も含め、より適切な分析法の検討を進める必要があると考えられるが、余剰活性汚泥から下水汚泥リサイクル製品までの挙動把握のための NP、NPnEO の分析については、抽出温度 100℃の条件設定で PFE 法を使用する方が、標準的に用いられている加熱還流法を使用するよりも適していると考えられる。

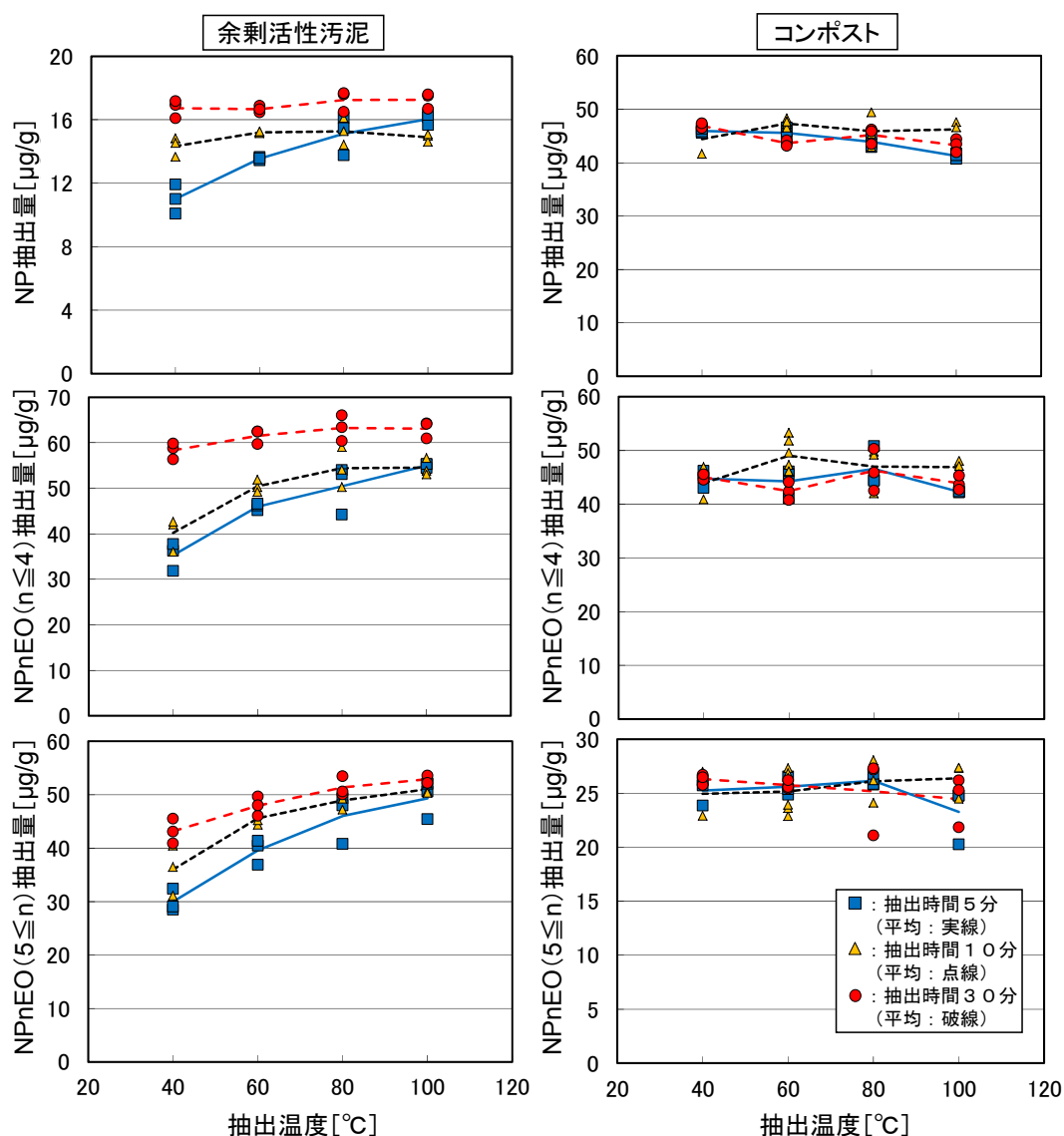


図 2.2 抽出温度と抽出量

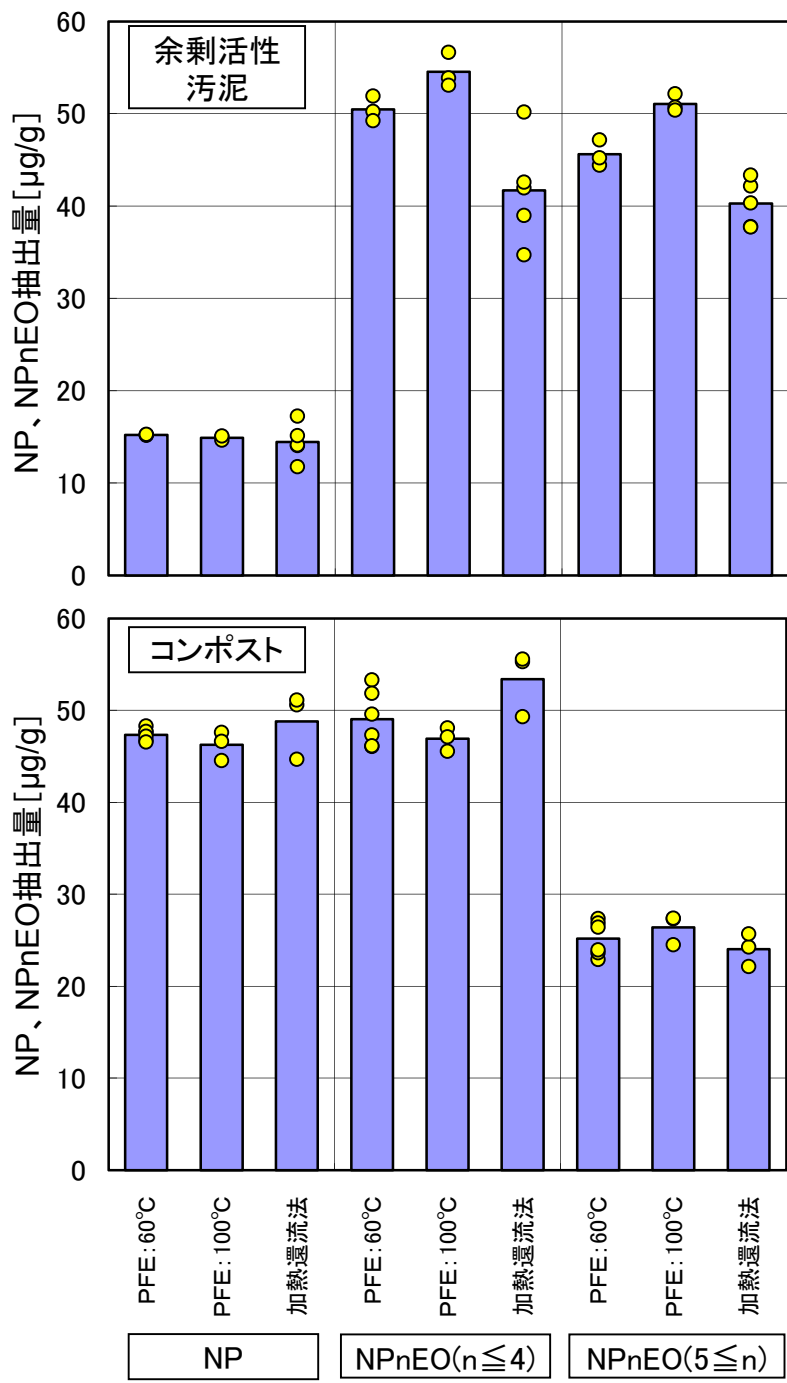


図 2.3 PFE法と加熱還流法との抽出量の比較

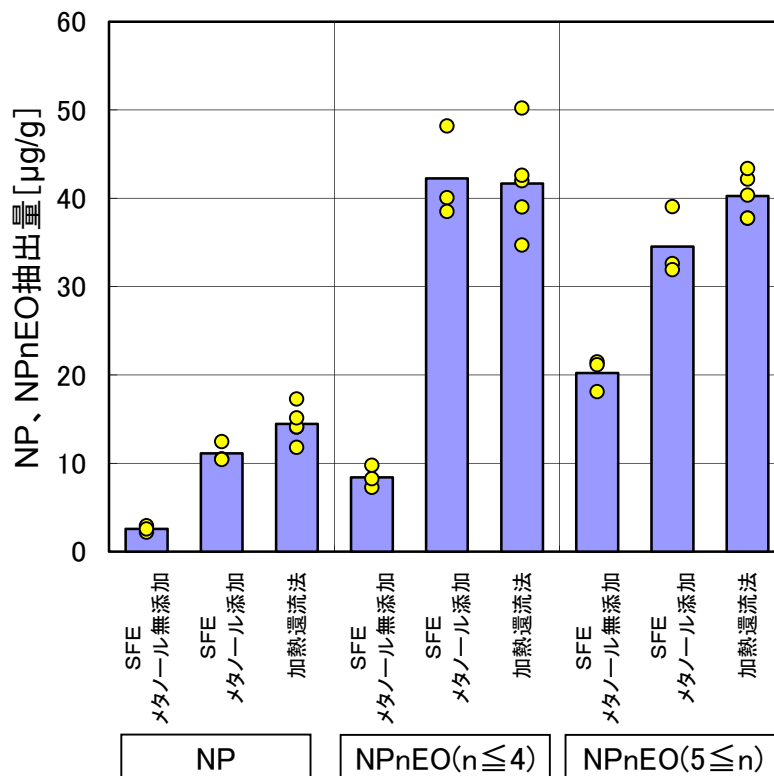


図 2.4 SFE法と加熱還流法との抽出量の比較

SFE法での検討については、PFE法での検討によりコンポスト試料からの抽出は余剰活性汚泥試料からの抽出よりも容易であると考えられたことから、より抽出が困難と考えられる余剰活性汚泥試料からのNP、NPnEOの抽出により検討することとした。

SFE法に関する結果を図2.4に示す。図中の点は個別の分析値(繰り返し回数各3~6回)、棒グラフは平均値をあらわしている。NP、NPnEOともに、二酸化炭素単独の場合と比較して、抽出時間は短いにもかかわらず、メタノールの添加により抽出量が1.7~5倍程度に増加することが明らかとなった。二酸化炭素単独の方が、抽出後の操作は簡易となり、SFE法の利点がより明確に生かせると考えられるが、少量の有機溶媒の添加は必須であると考えられた。

加熱還流法との比較では、ここで試した抽出条件では、SFE法でNP、NPnEOをより多く抽出することはできなかった。メタノール添加の場合、SFE法での抽出時間は加熱還流法の抽出時間の1/4であるが、抽出装置の装置的な限界でこれ以上長時間の抽出を一度に行うことは困難で、さらに操作の煩雑さ、装置の特殊性も考慮すると、SFE法でのさらなる抽出条件の検討には、抽出装置の大幅な改造が必要となると考えられた。

図2.3、図2.4の比較により、PFE法でのNP、NPnEO抽出量の方がSFE法での抽出量より多いことから、NP、NPnEOの抽出方法としては、PFE法が有利であると考えられた。

2.3 下水汚泥試料中のノニルフェノールエトキシカルボン酸類の分析

2.3.1 検討方法

NPnEC の分析は、水試料を対象とした、LC/MS/MS 法を用いる八十島らの方法¹⁹⁾にもとづいて行った。

分析フローの概略を図 2.5 に示す。NPnEC の汚泥試料からの抽出方法としては、検討が基礎段階であること、操作の容易さ、分析の前処理操作時および LC/MS/MS 装置への有機物の負荷が大きくなりすぎる可能性を考慮し、高速溶媒抽出法ではなく、水試料分析でのろ過残渣を対象とした抽出方法に倣い超音波抽出を用いた。なお、抽出は水試料では 15 分 2 回としているが、汚泥試料では 15 分 1 回とした。汚泥試料からの抽出溶媒としてメタノールまたはアセトン、pH 調整条件を pH3 および 7 とする各条件を比較した。クリーンアップのための固相抽出にはグラファイトカーボンカートリッジ（ジューエルサイエンス社）を用い、試料添加後、洗浄（ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (6 : 4)）し、抽出（ギ酸・ジクロロメタン : MeOH (9 : 1)）した。

検出に用いた LC/MS/MS 法では、LC は HP1100（ヒューレッドパッカー社）（HP Zorbax Eclipse XDB-C18、 $\phi 2.1\text{mm} \times 150\text{mm}$ 、カラム温度 40°C 、移動相 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (3 : 2)、MS/MS は TSQ7000（サーモクエスト社）（ESI 法 Negative）を用いた。

供試汚泥には余剰活性汚泥またはコンポストを 1mm 篩を通過させた後、風乾し 0.84mm 以下に粉砕したものを用いた。

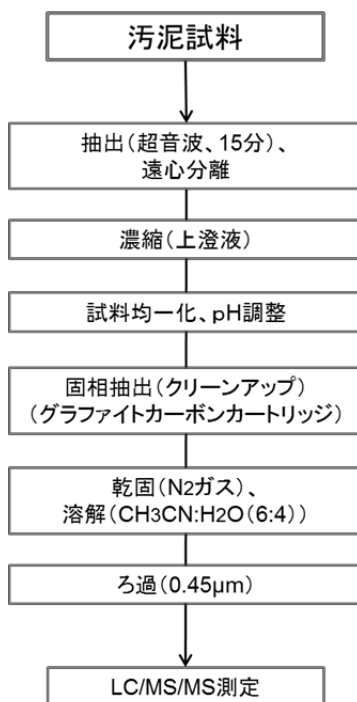


図 2.5 分析フローの概略

2.3.2 検討結果

抽出物の分析の結果、余剰活性汚泥試料ではアセトンよりメタノールを抽出溶媒とした方が抽出物が多く得られる傾向が見られたが、夾雑物が多く、安定した結果が得られなかった。また、コンポスト試料ではピークが分離できなかった。本検討では、下水汚泥試料中の NPnEC の存在実態が明らかではなかったことから、添加回収試験による評価も行った。試料 0.5g-dry にノニルフェノールエトキシ酢酸標準溶液（林純薬）2.5 μ g を添加し、分析したが、リテンションタイムの変動が大きく、ピークが分離できない場合が多く、分析ができていると仮定して敢えて数値化したピークについても変動係数が 30%を超える等、安定した結果が得られなかった。

水試料中の NPnEC の分析に用いられる前処理方法の応用では下水汚泥試料中の NPnEC の分析は困難であり、下水汚泥試料用の前処理方法の開発が必要であることが明らかとなった。

2.4 まとめ

有機物の多い下水汚泥試料中の NP 類の分析手法を開発するため、下水汚泥試料からの抽出方法の検討を行った。その結果、余剰活性汚泥からの NP、その主な前駆物質である NPnEO の抽出にメタノールを抽出溶媒とした PFE 法を用いることで、一般的に用いられている加熱還流法による抽出と比較し、抽出時間が 1/4 以下で、1.03~1.3 倍の NP 類を抽出することが可能であった。また、超臨界状態の二酸化炭素を用いた SFE 法による抽出を試みたところ、装置の制約もあり、PFE 法での抽出より多くの NP 類を抽出する条件を見出すことができなかった。

下水汚泥試料中の NP 類のうち NPnEC の分析手法の検討を行ったところ、水試料中の NPnEC の分析に用いられる前処理方法の応用では分析が困難であることが明らかとなった。

下水汚泥試料中の NP 類等の分析のための抽出については、いまだに検討が進んでいるとは言い難い状況にあるものの、現状ではここで検討した PFE 法や超音波抽出法が主に使用されており、分析法としての研究動向は、簡素化、自動化、省有機溶媒化に移っている⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。本研究の成果は、これらの研究に資するものであると考えられる。

第2章参考文献

- 1) 建設省河川局、建設省都市局下水道部 (1999) : 平成 10 年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果.
- 2) 森田弘昭、落修一、川嶋幸徳 (2000) : 下水汚泥中内分泌かく乱物質の消長に関する調査、平成 11 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 3755、pp.217-222、建設省土木研究所.
- 3) 建設省都市局下水道部監修 (1999) : 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル、pp.48-51、(社) 日本下水道協会.
- 4) 下水道における環境ホルモン対策検討委員会 (2000) : 下水道における内分泌攪乱化学物質調査マニュアル (案)、pp.74-76、建設省都市局下水道部.
- 5) 小森行也、田中宏明、竹歳健治 (1999) : 活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動、第 36 回下水道研究発表会講演集、pp.700-702、(社) 日本下水道協会.
- 6) U.S.EPA (2000) : Pressurized Fluid Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3545A, U.S.EPA, 2000. (U.S. EPA. 2007. Method 3545A (SW-846): Pressurized Fluid Extraction (PFE), Revision 1.).
- 7) Lindholm-Lehto,P.C., Ahkola,H.S.J. and Knuutinen,J.S. (2017) : Procedures of determining organic trace compounds in municipal sewage sludge—a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), pp.4383-4412.
- 8) Lin,J.-G., Arunkumar,R. and Liu,C.-H. (1999) : Efficiency of supercritical fluid extraction for determining 4-nonylphenol in municipal sewage sludge, *Journal of Chromatography A*, 840(1), pp.71-79.
- 9) Lee,H.-B., Peart,T.E., Bennie,D.T. and Maguire,R.J. (1997) : Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction, *Journal of Chromatography A*, 785(1-2), pp.385-394.
- 10) 社団法人化学工学会 (1999) : 化学工学便覧 改訂六版、pp.17-46、丸善 (株) .
- 11) 下水道における環境ホルモン対策検討委員会 (2001) : 下水道における内分泌攪乱化学物質調査マニュアル (案)、pp.103-110 及び pp.139-146、(社) 日本下水道協会.
- 12) Jiménez-Díaz,I., Ballesteros,O., Zafra-Gómez,A., Crovetto,G., Vílchez,J.L., Navalón,A., Verge,C., de Ferrer,J.A. (2010) : New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils, *Chemosphere*, 80(3), pp.248-255.
- 13) 八十島誠、小森行也、田中宏明 (2002) : 下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析、第 36 回日本水環境学会年会講演集、p.526、(社) 日本水環境学会.

- 14) Grzeškowiak,T., Czarczyńska-Goślińska,B. and Zgoła-Grzeškowiak,A. (2016) : Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens, *Trends in Analytical Chemistry*, 75, pp.209-226.
- 15) Gorga,M., Insa,S., Petrovic,M. and Barceló,D. (2014) : Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1352, pp.29-37.
- 16) Li,C., Jin,F. and Snyder,S.A. (2018) : Recent advancements and future trends in analysis of nonylphenol ethoxylates and their degradation product nonylphenol in food and environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 107, pp.78-90.

第3章 下水汚泥処理系におけるノニルフェノール類の挙動

3.1 はじめに

下水道に流入した内分泌かく乱物質（生物の内分泌作用をかく乱し生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると思われる物質等）が下水処理場の汚泥処理系へ移行している可能性が示されており¹⁾、下水処理場の汚泥処理プロセスを構成する個々の処理工程での内分泌かく乱物質の挙動・消長を明らかにすることが必要である。特に、内分泌かく乱物質の一つとされるノニルフェノール（NP）は界面活性剤等として用いられてきたノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）が分解して生成するとされている²⁾。この主要な分解経路は、主に好気条件下でNPnEOのエトキシ基（EO）側が短鎖化し、ノニルフェノールモノエトキシレート（NP1EO）、ノニルフェノキシ酢酸（NP1EC）が生成、これらが主に嫌気条件下でNPに分解するものとされている²⁾（図3.1）。湖沼水にNP類を添加し、室温、好気条件下で生分解速度係数を求めた例を図3.2に示す³⁾。これは下水試料での結果ではないが、好気条件下でEO基の短鎖化が比較的速く進む傾向にあることを示している。標準活性汚泥法等の好気処理を経験した余剰汚泥では、すでに好気分解が進んでいると考えられることから、EO基が短くなっているNPnEOやNPnECから汚泥処理プロセスの嫌気条件下でNPが生成する可能性が高い。SRTが異なる活性汚泥法の連続処理実験より得られた余剰活性汚泥と実処理場の最初沈殿池汚泥を供試汚泥とした嫌気性消化実験を試みた先行研究では、分析方法の検討が不十分な状況で行われたものではあるが、投入汚泥よりも消化汚泥での内分泌かく乱物質含有量が多く、エストロゲン様活性も高い傾向があった（表3.1）⁴⁾。第1章で示した通り、NPはNPnEOよりエストロゲン様活性が高いとされていることから、汚泥処理過程で汚泥の安定化が進んでいるにもかかわらず、エストロゲン様活性が高い物質が産生されているように見えている可能性がある。したがって、下水汚泥処理系でのNPの消長を、NPnEO、NPnECを含めて把握する必要がある。特に下水汚泥のエネルギー利用では重要なプロセスである嫌気性消化過程での消長を把握することが重要であると考えられる。

本研究では、下水汚泥処理系の嫌気性消化過程を想定した室内消化実験装置に、NP1EO、NP1EC、ノニルフェノールモノエトキシ酢酸（NP2EC）の純物質をそれぞれ添加し、NPの生成についてより詳細に検討することとした。

表3.1 先行研究での嫌気性消化実験における内分泌かく乱化学物質の分析結果⁴⁾ ($\mu\text{g/L}$)

		NP	NPE ($n \leq 4$)	NPE ($5 \leq n$)	17 β -E	Es-act	
最初沈殿池汚泥系	投入	50.7	265	35.4	11.5	12.3	
	消化	155.7	253	203	33.8	103.9	
係 数 状 態 比 較 係 数	SRT = 5day	投入	11.0	49.7	69.1	22.8	51.1
		消化	70.0	107.8	98.3	18.8	41.2
	SRT = 10day	投入	11.3	38.2	92.6	30.8	51.6
		消化	55.7	140.4	202	55.5	132.4
SRT = 20day	投入	13.9	37.0	48.0	20.7	25.0	
	消化	115.8	199.2	249	44.3	88.5	

出典：平成11年度下水道関係調査研究年次報告書集(土木研究所資料第3755号 2000年10月)

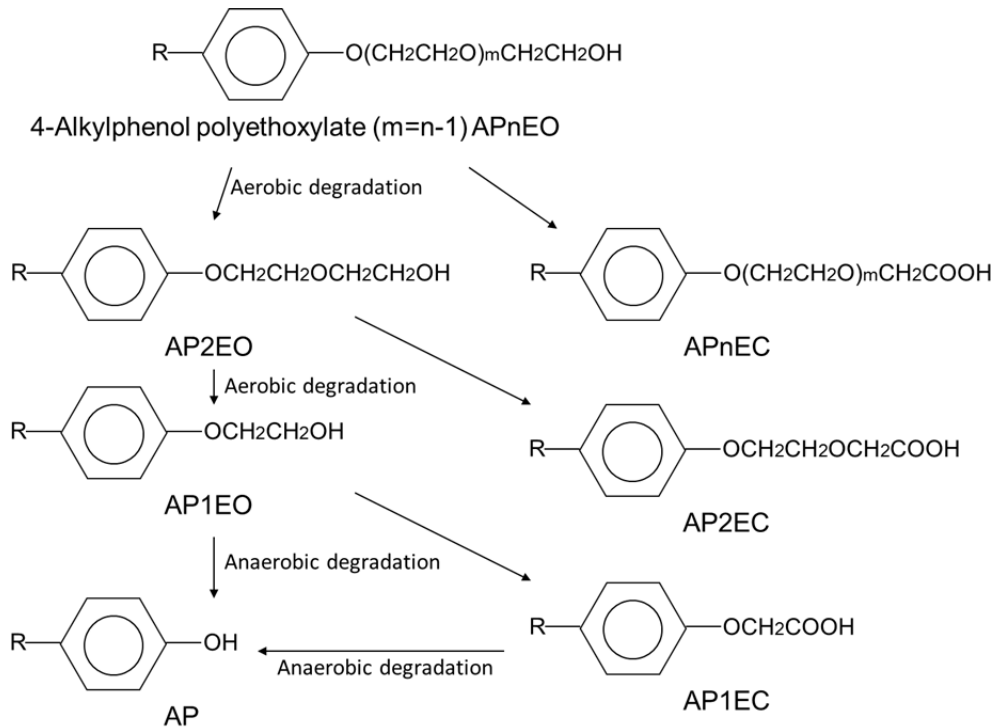
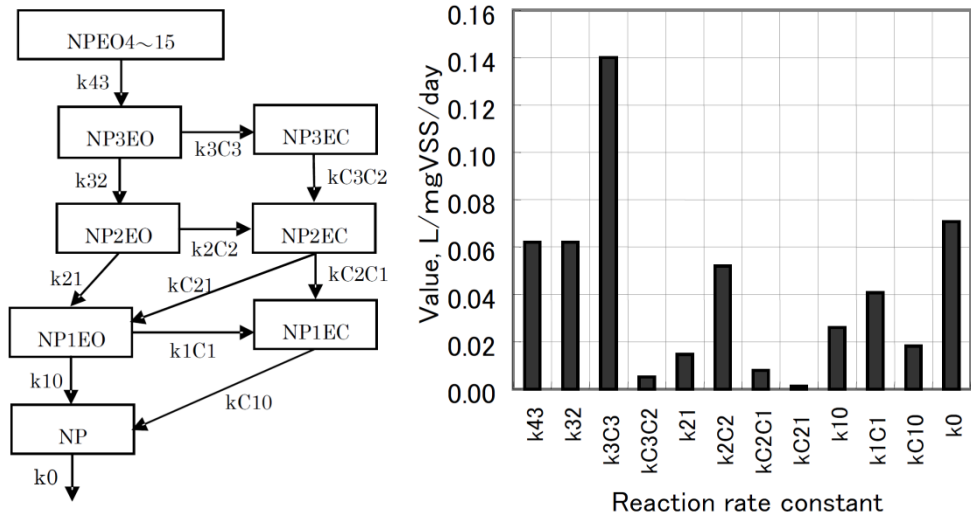


図 3.1 ノニルフェノール類の生物分解経路の概略 (既出、図 1.9)
 AP: Nonylphenol、R: C₉H₁₉ (参考文献^{2) 5) 6) 7) 8)}より作成)



出典:水環境における水質リスク評価に関する研究(土木研究所報告第209号 2008年)

図 3.2 ノニルフェノール類の分解速度係数の例³⁾

3.2 嫌気性消化過程におけるノニルフェノールエトキシレートの挙動

3.2.1 実験方法

実下水処理場から採取した濃縮汚泥が供給される嫌気性消化室内実験装置に NP1EO を添加し、消化汚泥中の NP、NP1EO の濃度変化を観察した。

実験装置の概略を図 3.3、写真 3.1 に示す。

約 5L のガラス瓶を用い、上部より濃縮汚泥の投入、消化汚泥の引き抜き、消化ガスの採取を行った。実験期間中は、ガラス瓶にアルミ箔を巻いて遮光した。実験は中温消化を想定し、35℃恒温室で行った。

実験装置の運転管理は、4L の汚泥に対し 200mL の濃縮汚泥の投入・消化汚泥の引き抜きを、休日を除く毎日 1 回行うことを基本として行った。平均滞留時間は約 28 日である。

実験に使用した濃縮汚泥は、実処理場より採取した初沈汚泥の重力濃縮汚泥と余剰汚泥の機械濃縮汚泥の混合物である。濃縮汚泥の NP 含有量は、平均 9.4 $\mu\text{g/g-dry}$ (6.2~11 $\mu\text{g/g-dry}$) であった。NP1EO の測定値は 10~83 $\mu\text{g/g-dry}$ の間で変動したが、投入実験開始後のほとんどの期間は平均 70 $\mu\text{g/g-dry}$ (65~83 $\mu\text{g/g-dry}$) で比較的安定していた。

NP1EO の添加は、消化汚泥を約 6 ヶ月間馴致した後に開始した。

NP1EO 添加系では、消化汚泥の引き抜き・濃縮汚泥の投入時に、NP1EO (林純薬製) 500 μg をメタノール 100 μL に溶解させた後、濃縮汚泥に添加してすみやかに装置に投入した。この添加量は、馴致期間中の消化汚泥中の NP 含有量 (40~50 $\mu\text{g/g-dry}$ 程度、図 3.4 参照)、濃縮汚泥中の NP1EO 含有量、およびそれらの分析精度を考慮して決定した。

NP1EO 無添加系 (対照系) では、NP1EO 添加系と同量のメタノールを濃縮汚泥に添加し、装置に投入した。

3.2.2 分析方法

分析対象物質は NP、NP1EO とした。

表 3.1 で示した NP 類の分析結果は振とう抽出法で得られたもので、余剰活性汚泥からの抽出が不十分であったと考えられることから、余剰活性汚泥から下水汚泥リサイクル製品までの NP 類の挙動把握にあたっては、汚泥試料からの分析対象物質の抽出法として、第 2 章で示した高速溶媒抽出法 (PFE 法) を用いる方法に基づいて行うこととした。PFE 法の抽出時間は、嫌気性消化室内実験で投入した濃縮汚泥を用いて事前に確認し、NP1EO の抽出量が多かった抽出時間 30 分の条件を用いることとした。

NP、NP1EO の測定には HPLC (Waters 2690、蛍光検出器 : Waters 474、カラム : GL サイエンス社 Inertsil Ph 5 μm , ϕ 4.6 \times 150mm) を用いた。

なお、消化汚泥への NP、NP1EO の添加回収試験を実験期間中に行ったところ、ここで用いた分析方法での回収率は約 80~117%であった。



写真 3.1 嫌気性消化室内実験装置

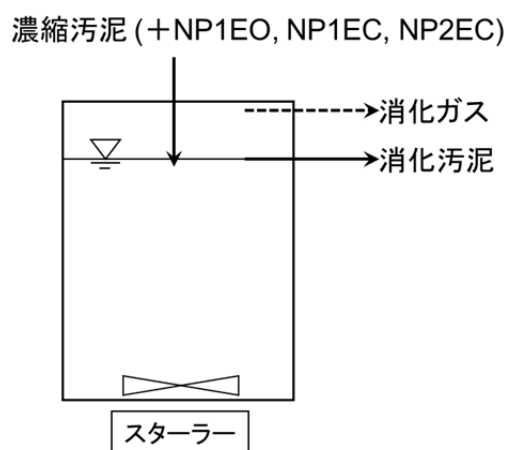


図 3.3 実験装置概略

3.2.3 実験結果

添加実験期間中の消化反応は比較的安定していた。炭素収支は、投入汚泥の炭素分のうち、消化ガスに 31~34%、引き抜き汚泥に 50~53%が移動しており、系全体としての回収率を概算したところ約 86%であった。

消化汚泥中の NP、NP1EO 含有量の推移をまとめ、図 3.4 に示す。横軸は NP1EO 添加開始からの経過日数、縦軸は乾泥基準の NP または NP1EO の含有量である。図中の点線は、投入 NP1EO 全量が NP に変化し、残留したと仮定した場合の計算値である。

NP1EO 添加系では、実験開始 1 週間の NP1EO の残留量は投入 NP1EO の 22~26%であり、その後この比率は減少し、約 50 日以降は残留量が減少する傾向となった。実験開始当初および約 50 日目の平日の NP1EO 分解速度は各々約 $7\mu\text{g}/(\text{g-dry}\cdot\text{day})$ 、約 $10\mu\text{g}/(\text{g-dry}\cdot\text{day})$ であった。

NP1EO の投入による NP 量の増量は、投入 NP1EO の約 40%が NP に変化し、NP として残留した量に相当する量で推移した。今回の実験では、投入 NP1EO の全量が NP になるのではなく、一部は分解または NP 以外の形態になっていることが明らかとなった。

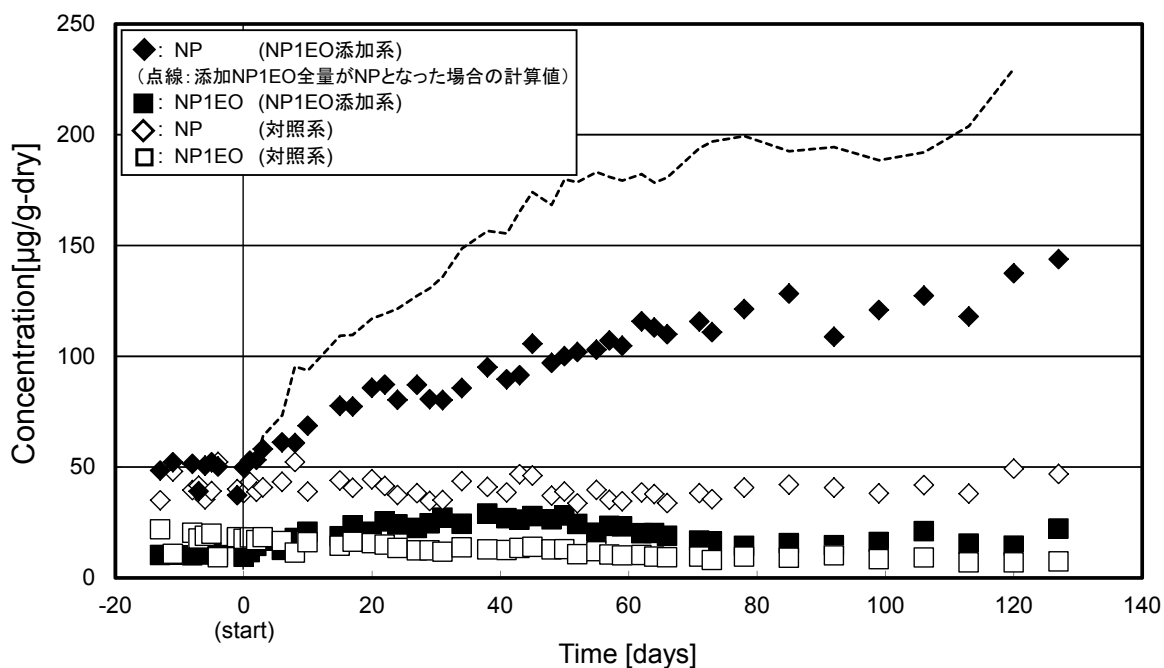


図 3.4 NP1EO 添加実験結果

3.3 嫌気性消化過程におけるノニルフェノールエトキシカルボン酸類の挙動

3.3.1 実験方法

実下水処理場から採取した濃縮汚泥が供給される嫌気性消化室内実験装置に NP1EC、NP2EC を添加し、消化汚泥中の NP、NP1EO の濃度変化を観察した。

実験方法は前述の NP1EO 添加実験とほぼ同様である。実験装置の運転管理は、4L の汚泥に対し 200mL の消化汚泥の引き抜き・濃縮汚泥の投入を、休日を除く毎日 1 回行うことを基本として行った。平均滞留時間は約 28 日、消化温度は 35℃とした。用いた濃縮汚泥は、下水処理場で採取されたものであり、初沈汚泥の重力濃縮汚泥と余剰汚泥の機械濃縮汚泥の混合物である。

NP1EC、NP2EC の添加は、pH、ガス発生量等がおおむね安定したと考えられた、馴致開始から 50 日後に開始した。

NP1EC 添加系、NP2EC 添加系では、消化汚泥の引き抜き・濃縮汚泥の投入時に、それぞれの純物質（林純薬製）500μg をメタノール 100μL に溶解させた後、濃縮汚泥に添加し、すみやかに装置に投入した。この添加量は、濃縮汚泥、消化汚泥中にあらかじめ含まれている NP1EC、NP2EC の分析が困難であり、その実態が不明であったことから、NP1EO 添加実験での添加量と同量とした（3.2 節参照）。

対照系では、NP1EC 添加系、NP2EC 添加系の場合と同量のメタノールを濃縮汚泥に添加し、装置に投入した。

3.3.2 分析方法

分析対象物質は NP、NP1EO とした。第 2 章で示した通り、下水汚泥試料中の NPnEC の分析が困難であった。そのため、NP1EC、NP2EC の添加による NP、NP1EO 含有量の変化で挙動を把握することとした。

本実験で得られる消化汚泥試料の分析にあたり、添加する NPnEC が NP や NPnEO の分析に影響しないことを確認する必要がある。そこで、標準液を用いて HPLC のクロマトグラム（図 3.5）を確認したところ、NPnEC は、NP や NPnEO より早い時間帯に流出し、目立った妨害を起こさないことが明らかとなった。そのため、分析方法は前述の NP1EO 添加実験と同様とすることとした。

下水汚泥からの NP、NP1EO の抽出は第 2 章で示した高速溶媒抽出法を用いる方法に基づいて行い、抽出時間は 30 分とした。NP、NP1EO の測定には HPLC（Waters 2690、蛍光検出器：Waters 474、カラム：GL サイエンス社 Inertsil Ph 5μm, φ4.6×150mm）を用いた。

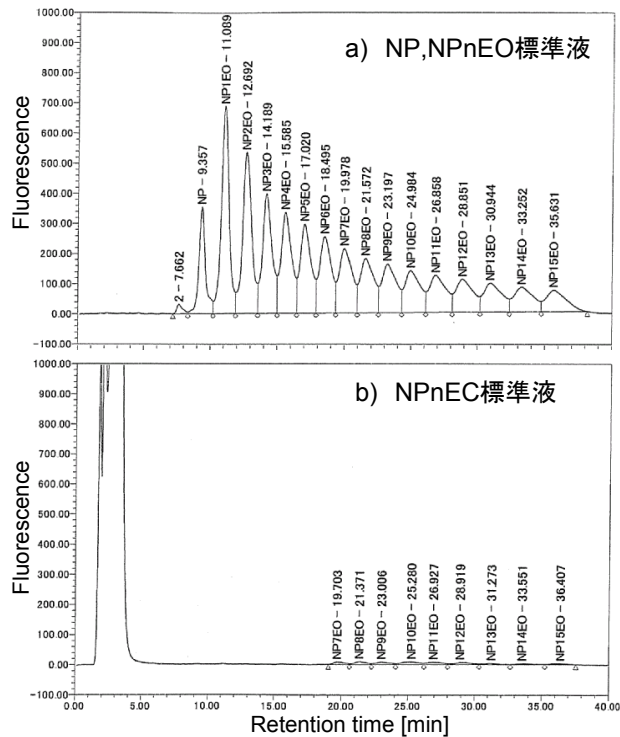


図 3.5 NPnEC の NP、NPnEO の分析への影響

3.3.3 実験結果

添加実験期間中の消化反応は比較的安定していた。

実験結果を図 3.6 に示す。横軸は NP1EC または NP2EC の添加開始からの経過日数、縦軸は乾泥基準の NP または NP1EO の含有量である。図中の点線は、投入 NP1EC 全量が NP に変化し、残留したと仮定した場合の計算値である。

NP1EC 添加系では、添加開始直後より実験装置内の NP 量が上昇した。NP の増量は実験期間の平均で、投入 NP1EC のほぼ 100% に相当する量であった。このことから、添加した NP1EC のほぼ全量が NP になっている可能性が高いことが明らかとなった。

NP2EC 添加系では、添加開始前後で、NP、NP1EO 含有量に大きな変化は見られず、対照系とほぼ同様の結果となった。NP1EC 添加系での結果も踏まえると、嫌気性消化過程では、NP、NP1EO 含有量に影響を与える速度で NP2EC から NP、NP1EO、NP1EC が生成する可能性は低いと考えられた。

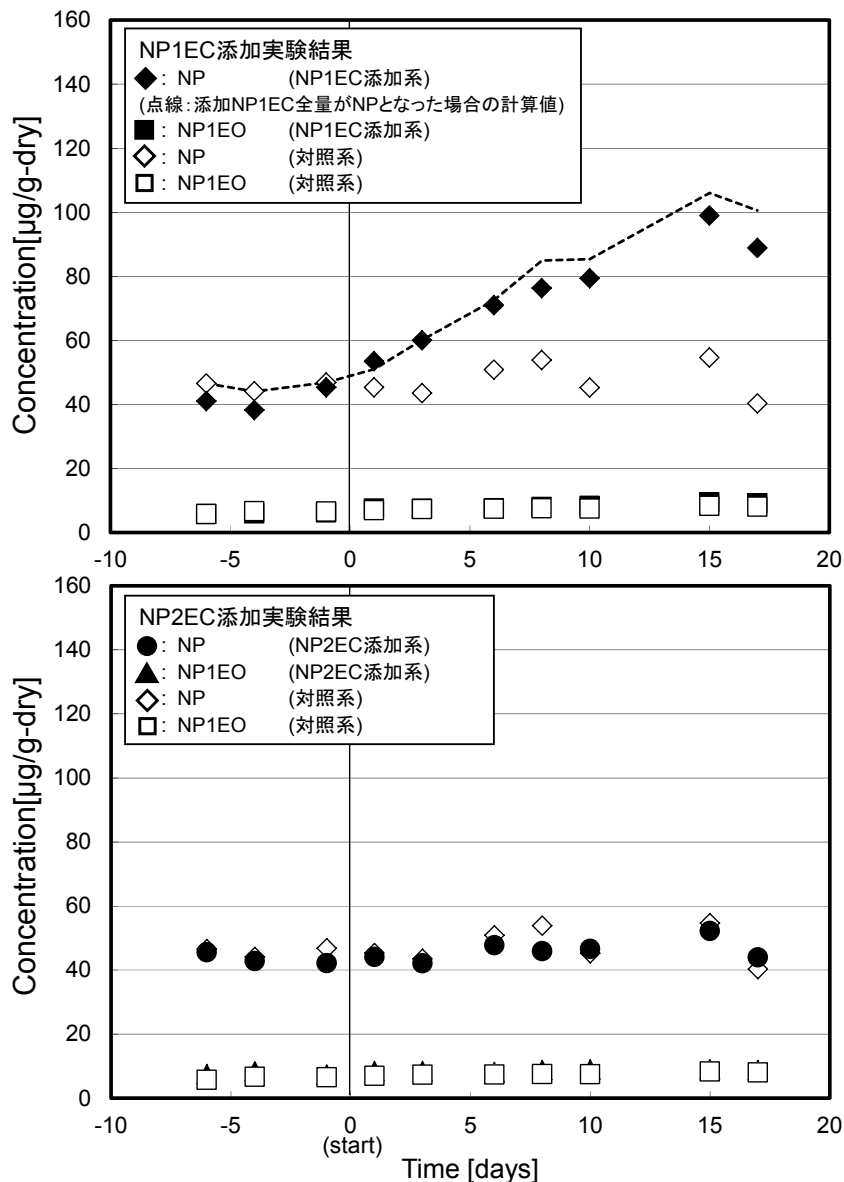


図 3.6 NP1EC、NP2EC 添加実験結果

3.4 考察

嫌気性消化過程では、下水道に流入する NPnEO が分解し、NP を生成するとされているが、NP1EO に関しては全量が NP になるのではなく、一部は分解または NP 以外の形態になっていることが明らかとなった。一方、NP1EC に関しては、ほぼ全量が NP となる可能性が示された。これらは、35°Cの中温消化条件で消化槽を運転する場合は、NP1EO や NP1EC の多くが NP として蓄積することを示している。

Bozkurt らは、嫌気性消化毒性試験で NP2EO を添加 (1~30mg/L) した実験結果を報告しており⁹⁾、NP2EO はすべて消滅し、NP1EO または NP として蓄積し、72 日間では完全分解には至らなかったとしている。また、比較的高濃度で NP2EO が添加された場合は NP1EO が比較的多く蓄積していたが、低濃度条件では主に NP が蓄積していたと報告している⁹⁾。また、セミバッチ式嫌気性消化実験 (35°C、滞留時間 15 日) で NP2EO を添加 (3mg/L、パルス応答) した実験結果¹⁰⁾ では、NP2EO の濃度は最初の 30 日程度で急激に低下し、添加後約 60 日で添加前の濃度と同程度となった。NP1EO の濃度は最初の 10 日程度は上昇したもののその後減少に転じ、NP2EO 添加から 60 日程度で概ね一定の濃度で蓄積した。NP 濃度は 30 日程度上昇したのち、蓄積した状態では安定していた。この実験¹⁰⁾ では NP1EC は検出されなかった。

これらの実験結果は、実験条件によると考えられる違いはあるものの、本研究で得られた結果と同様の傾向を示しており、嫌気性消化過程では最終的に NP 等が蓄積することを示している。

消化汚泥を緑農地利用するにあたり、NP 類をさらに低減させるための方法として、コンポスト化過程等、好気過程による NP 類の分解が考えられる。

嫌気性消化過程とは両立しないと考えられるが、好気性消化過程についてはバッチ実験による NP2EO の分解に関する報告がある¹¹⁾。この報告によると、NP2EO の添加 (3mg/L、パルス応答) により、最初の数日間は NP1EO 濃度がやや増加するものの、その後 NP1EC が増加した¹¹⁾。物質収支上 NP2EC を経由したのものもあると考えられるが、最終的に NP1EC として反応器に蓄積したと報告している¹¹⁾。この結果からは、NP 類が好気性消化過程で完全分解に至るのは困難であると考えられる。

コンポスト化については、羊毛洗浄工場廃水を対象とした処理で発生した汚泥に関する知見が報告されている¹²⁾。この報告では、汚泥のコンポスト化により NPnEO の短鎖化、NP の生成、NP 類総量の減少とともに、300 日以上を経過しても完全分解には至らなかったことが示されている。下水汚泥を対象とした報告でも、NPnEO の初期濃度が高い場合、NPnEO の分解により NP 濃度が当初より 90% 程度上昇するとの結果が得られている¹³⁾。また、副資材を用いたコンポスト化実験の報告では、一次発酵の温度が高すぎる場合 NP 分解率は低下し、換気時間を増加させると見掛けの NP 分解率が高くなると報告しており、きのこ残渣 20% を含む下水汚泥で、最も高い見掛けの NP 分解率 (71.6%) が得られたとされていることから¹⁴⁾、コンポスト化過程での NP 含有量の制御の可能性はあるものの、完全分解には至らなかったこととなる。以上から、嫌気性消化過程の後で、コンポスト化を実施することにより、NP 類の総量を減少させることはできるが、NP を完全に分解させるまでには至らない可能性が高く、最終生成物であるコンポスト等の下水汚泥リサイクル製品には NP 類が存在すると考えられる。日本の下水汚泥を主な原料とする 12 種のコンポストを対象とした含有量試験の結果によると、全てのコンポスト試料から NP 類が検出され、NPnEO の EO 基の短鎖化および嫌気性消化汚泥を原料とするコンポストの NP 含有量が比較的高濃度であることが報告されている¹⁵⁾。この報告では、コンポスト化にあたり病原微生物対策として温度を 65°C 以上とすることにより、NP 類の生物分解活性が低下するとの仮説を立てている¹⁵⁾。

以上より、汚泥処理系に NP 類が到達した場合、汚泥処理過程での完全な分解は期待できず、コンポスト等の下水汚泥リサイクル製品に NP 類が含まれることとなると考えられる。

3.5 まとめ

下水汚泥処理系での内分泌かく乱物質の挙動・消長を明らかにすることを目的として、嫌気性消化室内実験を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- ・ 実下水処理場より採取された濃縮汚泥を用い、滞留時間約 28 日、35°C で運転している嫌気性消化実験装置に NP の前駆物質の一つである NP1EO を投入したところ、約 40% に相当する量の NP として消化汚泥中に存在することが明らかとなった。実験開始当初および約 50 日目の平日の NP1EO 分解速度は各々約 7 $\mu\text{g}/(\text{g-dry}\cdot\text{day})$ 、約 10 $\mu\text{g}/(\text{g-dry}\cdot\text{day})$ であった。
- ・ 実下水処理場より採取された濃縮汚泥を用い、滞留時間約 28 日、35°C で運転している嫌気性消化実験装置に NP の前駆物質の一つである NP1EC および NP2EC を投入した。その結果、投入した NP1EC のほぼ全量に相当する量が NP として消化汚泥中に存在することが確認された。一方、NP2EC に関しては、NP 濃度に影響しなかった。

本研究で得られた結果に加え、コンポスト化過程に関する報告¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾も踏まえると、汚泥処理系に NP 類が到達した場合、汚泥処理過程での完全な分解は期待できず、コンポスト等の下水汚泥リサイクル製品に NP 類が含まれることとなると考えられる。したがって、下水汚泥リサイクル製品の施用先での消長に関する知見を増やす必要があると考えられる。

嫌気性消化過程における NP 類の挙動に関しては、高温消化条件 (55°C) での実験結果が報告されている¹⁶⁾。この報告では NP2EO、NP の分解が進み、NP1EO が蓄積するとしており¹⁶⁾、高温消化では中温消化とは異なった挙動を示している。この知見は、嫌気性消化過程での NP 類の制御に向けた操作因子の存在の可能性を示している。また、水処理過程において嫌気性 MBR と活性汚泥処理とを直結し NP 類等の微量物質を処理する実験が報告されており¹⁷⁾、下水処理過程全体としての微量物質制御に関する研究が進んでいる。本研究の成果は、これらの研究の進展に資するものであると考えられる。

第3章参考文献

- 1) 国土交通省都市・地域整備局下水道部 (2001) : 平成 12 年度 下水道における内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) に関する調査報告書 (案) .
- 2) Ahel,M., Giger,W. and Koch,M. (1994) : Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment - I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment, *Water Research*, 28, pp.1131-1142.
- 3) 土木研究所 (2008) : 水環境における水質リスク評価に関する研究、土木研究所報告、209、pp.55-122、(独) 土木研究所.
- 4) 森田弘昭、落修一、川嶋幸徳 (2000) : 下水汚泥中内分泌かく乱物質の消長に関する調査、平成 11 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 3755、pp.217-222、建設省土木研究所.
- 5) Giger,W., Brunner,P.H. and Schaffner,C. (1984) : 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science*, 225(4662), pp.623-625.
- 6) Talmage,S.S. (1994) : Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates, pp.253-255, Lewis publishers.
- 7) Manzano,M.A., Perales,J.A., Sales,D. and Quiroga,J.M. (1998) : Effect of Concentration on the Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate in River Water, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4), pp 489-496.
- 8) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課 (2004) : 平成 15 年度内分泌攪乱化学物質における暴露経路調査結果について、pp.1-33、平成 16 年度第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会、平成 16 年 12 月 24 日、資料 2-3.
- 9) Bozkurt,H. and Sanin,F.D. (2014) : Toxicity of nonylphenol diethoxylate in lab-scale anaerobic digesters, *Chemosphere*, 104, pp.69-75.
- 10) Murdoch,F.K. and Sanin,F.D. (2016) : Biotransformation of Nonylphenol Diethoxylate in anaerobic digesters: Accumulation of metabolites and their effects on digester performance, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, pp.61-68.
- 11) Ömeroğlu,S. and Sanin,F.D. (2014) : Fate and degradation kinetics of nonylphenol compounds in aerobic batch digesters, *Water Research*, 64, pp.1-12.
- 12) Jones,F.W. and Westmoreland,D.J. (1998) : Degradation of Nonylphenol Ethoxylates during the Composting of Sludges from Wool Scour Effluents, *Environmental Science and Technology*, 32(17), pp.2623-2627.
- 13) Pakou,C., Kornaros,M., Stamatelatou,K. and Lyberatos,G. (2009) : On the fate of LAS, NPEOs and DEHP in municipal sewage sludge during composting, *Bioresource Technology*, 100(4), pp.1634-1642.

- 14) Zheng,G., Chen,T., Yu,J., Gao,D., Shen,Y., Niu,M. and Liu,H. (2015) : Impact of composting strategies on the degradation of nonylphenol in sewage sludge, *Ecotoxicology*, 24(10), pp.2081-2087.
- 15) Yamashita,H., Ozaki,M., Minamiyama,M., Igarashi,I. and Suzuki,Y. (2005) : Nonylphenolic Compounds in Sewage Sludge Composts, IWA International Conference – Sustainable Development of Chemical Industries with the Environment – Waste and Wastewater Management – (Chemical Industries 2005) Program and Abstracts, pp.59-62, 14-15 July, 2005, Tsukuba and Kashima, Japan.
- 16) Samaras,V.G., Stasinakis,A.S., Thomaidis,N.S., Mamais,D. and Lekkas,T.D. (2014) : Fate of selected emerging micropollutants during mesophilic, thermophilic and temperature co-phased anaerobic digestion of sewage sludge, *Bioresource Technology*, 162, pp.365-372.
- 17) Abargues,M.R., Ferrer,J., Bouzas,A. and Seco,A. (2018) : Fate of endocrine disruptor compounds in an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) coupled to an activated sludge reactor, *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4(2), pp.226-233.

第4章 下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動

4.1 はじめに

下水汚泥の有効利用が進められていく中で、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質（生物の内分泌作用をかく乱し生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると考えられている物質等）の消長を明らかにすることが重要であり、そのためには施用先の状況を再現した実験施設による長期間の調査が必要である。

下水汚泥リサイクル製品の土壌施用先での挙動把握の基礎情報とするために、コンポストと乾燥汚泥を用いた溶出実験が先行研究として行われた¹⁾。以下に、その概略を示す。

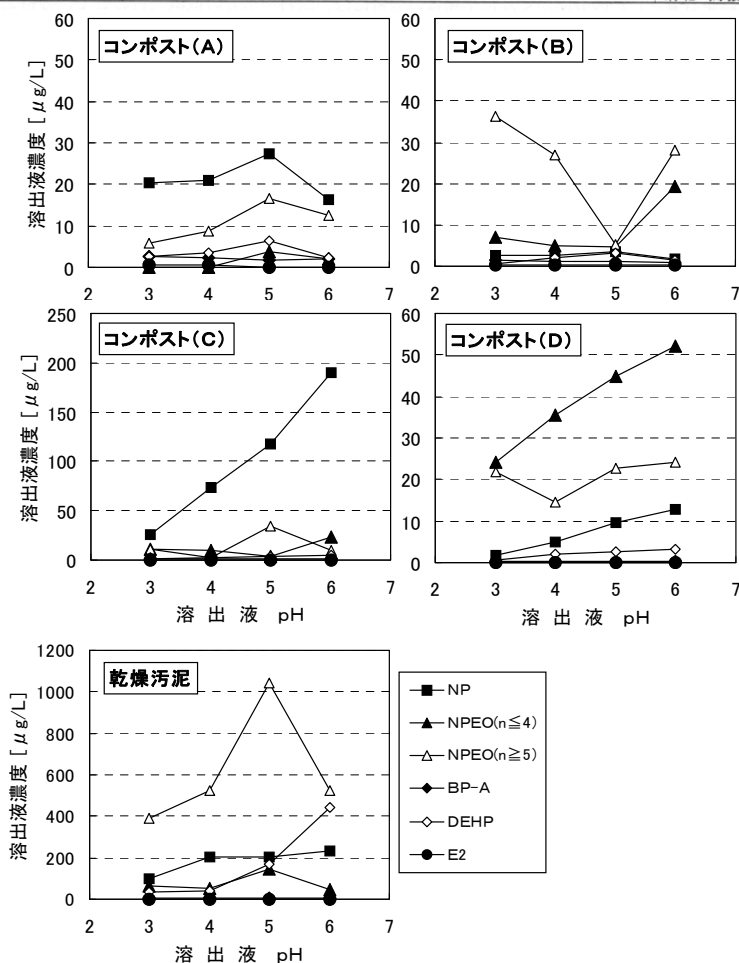
実験は、原料や製造方法が異なるコンポスト四種類と乾燥汚泥一種類を用い、全量を5mmの篩を通過させたものを供試体とし、乾燥重量で400gに相当する供試体に対して、4Lのイオン交換蒸留水を作用させ2N-HCl又は10N-HCl溶液を用いてpHを6、5、4、3に別々に自動制御しながら20°Cの恒温室にて24時間の溶出実験を行った。

24時間経過後の試料は、直ちに3,000rpmで20minの遠心分離を施し、上澄み液を1µmのグラスファイバーろ紙にてろ過した。得られたろ液は、ノニルフェノール（NP）やノニルフェノールエトキシレート（NPnEO(n≤4)、NPnEO(n≥5)）、17β-エストラジオール（E2）、ビスフェノールA（BP-A）およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）の分析に供した。分析方法は既往の方法²⁾によった。

実験結果を図4.1に示す。全体的な傾向は、NPやNPnEOが溶出し易く、また、中性近傍での溶出量が多く、酸性となるほど溶出しづらいというものであった。酸性側における溶出の抑制傾向があることから、降雨による土壌からの溶脱が幾分制限されている可能性が示された。

以上に示した先行研究¹⁾結果を踏まえ、土壌での内分泌かく乱物質の挙動を把握するため、本研究では、下水汚泥コンポストを施用した土壌を用いた屋外での長期ライシメータ実験を行うこととした。対象とした物質は、第3章までの結果により下水汚泥リサイクル製品に一定量含有される可能性が高いと考えられることに加え、先行研究¹⁾により比較的溶出しやすいと考えられたNP類と、エストロゲンそのものであり、既報（第1章参照）で汚泥処理系での除去が困難であると考えられているE2とした。なお、本実験の初期設定は先行研究の中で行った¹⁾。また、下水汚泥を施用した土壌からの植物体への内分泌かく乱物質の移行の有無を確認するため、植物体への移行確認実験を温室にて行った。この実験では、植物体を対象としたE2の測定が困難であったことから、人為的な化学物質であるNP類の植物体への移行を確認することとした。

試料	含水率 (%)	VS/DS (%)	水溶性 (mg/g-DS)			備考	
			pH	NH ₄ -N	NO ₂₊₃ -N		PO ₄ -P
コンポスト(A)	34.7	36.8	7.8	0.054	1.84	2.08	消化・塩鉄石灰系
コンポスト(B)	26.9	42.4	7.7	4.21	0.0125	0.0075	生・塩鉄石灰系
コンポスト(C)	37.0	71.3	7.5	4.59	0.274	1.15	消化・高分子系
コンポスト(D)	50.5	80.2	3.5	3.47	0.098	0.062	生・高分子系
乾燥汚泥	35.7	70.5	7.6	1.16	0.0035	0.030	消化・間接乾燥



出典：平成11年度下水道関係調査研究年次報告書集(土木研究所資料第3755号 2000年10月)

図 4.1 先行研究における溶出試験の結果¹⁾より作成

4.2 ライシメータ実験

4.2.1 実験方法

本実験は1999年10月に開始し、2002年8月までの約2年10ヶ月にわたって実施した。

本実験で使用したライシメータを写真4.1、ライシメータ内部の概略を図4.2に示す。幅1m×奥行1m×高さ1mのステンレス製のライシメータ6基を屋外に設置した。

各ライシメータの設定条件を表4.1に示す。

図4.2で「土壌」と記されている部分に、表4.1に示した条件で調製した土壌を充填した。下水汚泥コンポストを施用した系には10kg-現物/基のコンポストを、また薬品を添加した系にはNP及び

E2 をそれぞれ約 500mg/基、約 17mg/基、土壌（赤土）と混合した。また、下水汚泥コンポストを施用し耕耘を行うこととした系については土壌採取毎に耕耘した。

コンポストの施用量は約 6kg-dry/m²に相当する量とした。都道府県における農用地への下水汚泥の施用基準、指針等³⁾では、概ね 1kg-dry/m²（普通畑（野菜等））、3kg-dry/m²（花木（植木））程度が年間施用量の上限となっている。この実験で設定した施用量は比較的高濃度の設定となっているが、これは、旧来の分析精度から比較的高濃度での NP、E2 が存在している必要がある一方で、常用とかけはなれた高率でのコンポストの施用は、土壌環境での物質の挙動を把握する上で異なった浸出機構となる可能性があることを考慮して設定したものである。そのため、コンポスト施用の有無に加え、NP、E2 を添加する条件（ケース 2、5、6）も設定した。

仕込み土壌の調製は以下の手順により行った。

NP と E2 の添加にあたり、あらかじめそれぞれ 1,500 mg、50 mg を 1L のメタノールに溶解し、混合原液を調製した。ライシメータ 1 基につき土壌を 330L（258kg-湿）計量し、そこから約 10L を分取して NP と E2 の混合原液を 333 mL 添加した（ライシメータ 1 基あたり NP を 500mg、E2 を 16.7mg 添加することに相当）。残りの土壌には下水汚泥コンポストを現物として 10 kg 混合し、十分に攪拌した。これに、NP と E2 を混合した土壌の全量を戻し、更に十分に攪拌した後、ライシメータに仕込んだ。

実験に使用した土壌は茨城県南部で代表的に見られる赤土であり、農薬や肥料にあまりさらされていないものを茨城県石岡市で採取した。土壌は全て 5mm 以下に篩い分けたものを用いた。

実験に使用した下水汚泥コンポストは高分子系の消化脱水汚泥を原料とし、破碎したモミガラを副資材として発酵したものである。

実験では、気象を連続観測するとともに、適宜、土壌と浸出水を採取した。

浸出水の採取はライシメータの下部より全量を採取した。

土壌の採取は、ライシメータ上部よりアクリル円筒を挿入してコアを採取し、コアを深さ方向の中央で上層と下層に分け、分析に供した。土壌試料採取箇所を図 4.3 に示す。過去に採取実績のあるところを避けて土壌試料を採取した。耕耘を行わないケースについては、採取でできた穴を周りの土が逆転しないように注意してくずして埋めた。最終試料採取時には土壌表面の状況も考慮しつつ、ステンレススコップを用いて広範囲から試料を採取した。ライシメータの土壌表面の雑草については適宜取り除いた。

4.2.2 分析方法

ライシメータからの浸出水および土壌中の NP 類及び E2 の分析は、本実験を開始した時点で用いられていた分析マニュアル⁴⁾を参考とし、NP は GC/MS 法、NPnEO は HPLC 法、E2 は ELISA 法を用いて測定した。

表 4.1 ライシメータへの仕込み条件

	土壌条件	備考
ケース 1	土壌	(対照系)
ケース 2	土壌 + 薬品 (NP, E2)	
ケース 3	土壌 + コンポスト	
ケース 4	土壌 + コンポスト	土壌採取毎に耕耘
ケース 5	土壌 + コンポスト + 薬品 (NP, E2)	
ケース 6	土壌 + コンポスト + 薬品 (NP, E2)	土壌採取毎に耕耘

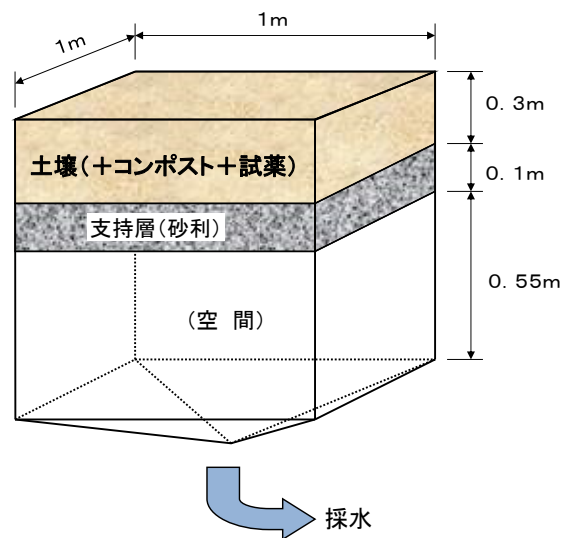


図 4.2 ライシメータ内部



出典：平成11年度下水道関係調査研究年次報告書集(土木研究所資料第3755号 2000年10月)

写真 4.1 ライシメータ実験装置¹⁾

↑

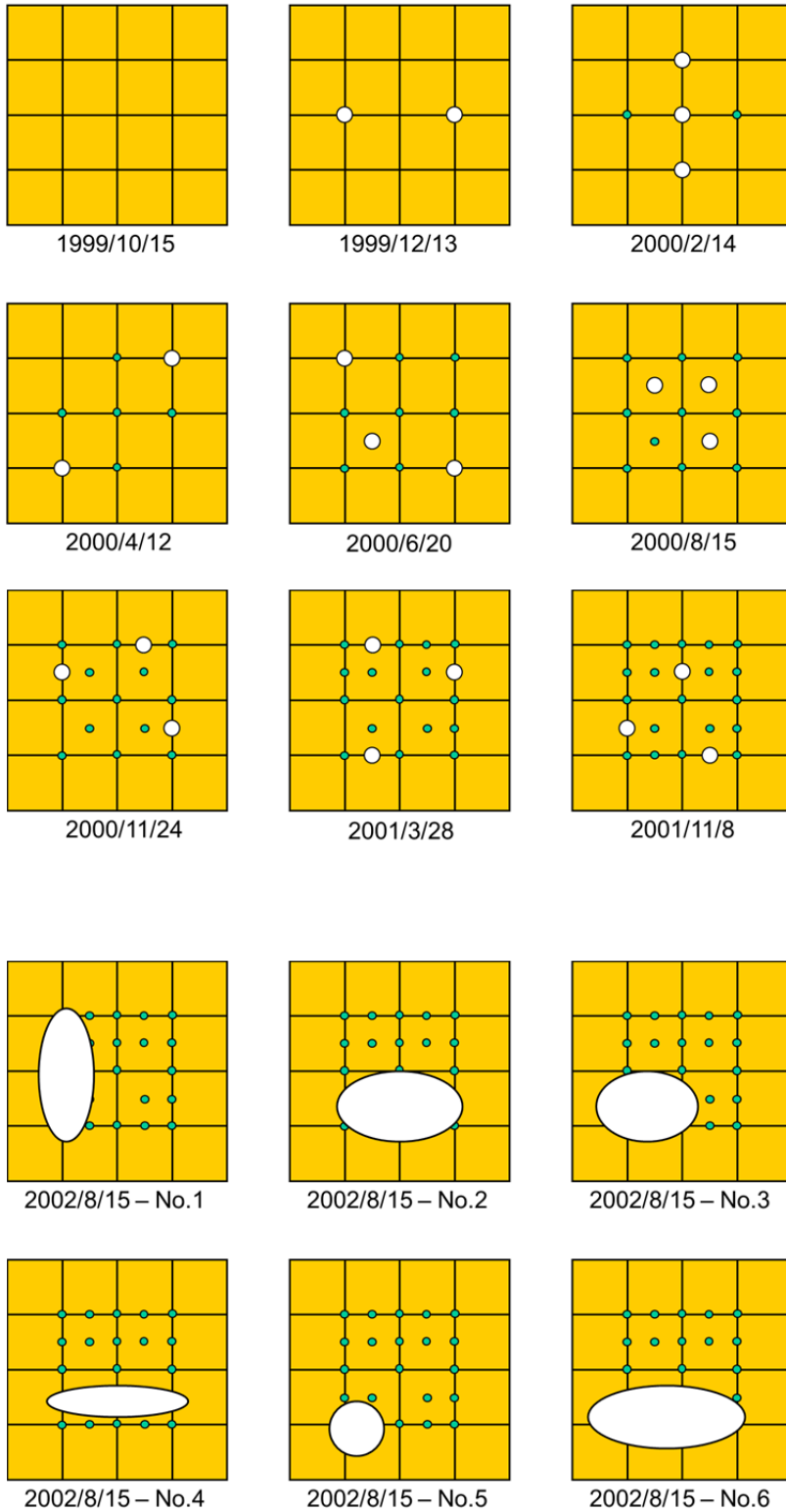


図 4.3 試料採取点（白丸：採取箇所、緑丸：既に採取実績がある箇所）

NP 類の測定にあたり、土壌試料からの抽出には超音波抽出（メタノール溶媒）を用いた。NP の測定には GC/MS（島津 QP-5050A）を使用した。NPnEO($n \leq 4$)、NPnEO($n \geq 5$)の測定には HPLC（Waters 2690、蛍光検出器：Waters 474、カラム：GL サイエンス社 Inertsil Ph 5 μ m, ϕ 4.6 \times 150mm）を用いた。

E2 の測定にあたり、土壌試料からの抽出には超音波抽出（メタノール溶媒）を用いた。検出には 17 β -Estradiol ELISA kit（Assay Design 社）を用いた。ELISA 法については、E2 と構造が似ている他の物質を合わせて測定している可能性が指摘されている⁵⁾。試みに LC/MS/MS 法⁶⁾により本実験に使用したコンポストと同種のコンポストについて、エストロン（E1）、E2、17 α -エチニルエストラジオール（EE2）含有量を測定した（高速溶媒抽出、超臨界抽出または振とう抽出の後、C₁₈、フロリジル、アミンカラムでクリーンアップし、HP1100（ヒューレッドパッカード社）（HP Zorbax Eclipse XDB-C18）、TSQ7000（サーモクエスト社）で E1、E2、EE2 を検出）。その結果、E2、EE2 は検出されず、E1 が検出された。しかしながら、データの連続性を保つため、ここでは E2 用 ELISA 法で得られた値を E2 の濃度として扱い、E2 と表記する。

TOC の測定には、TOC 計（島津 TOC-5000A）を用いた。

4.2.3 実験結果と考察

(1) 実験の状況

実験期間中の降雨状況と採水量の例を図 4.4 に、気温、地中温度（15cm）を図 4.5 に示す。主だった降雨の後に採水を行った。各ライシメータで浸出水量は異なっていた。これは、土壌の締めり方が異なっていたためであると考えられる。また、実験期間中、浸出水の pH は 7 前後で推移した。

ライシメータは、実験開始後 260 日目頃に局地的な強い降雨を経験している。記録された降雨量は、周辺施設からの跳水の影響等も受けている可能性があることから、値自体が正確とは言い切れないが、この時期のライシメータへの降水負荷は大きく、直後の採水時の浸出水量も多かった。なお、実験期間中、気象観測装置のメンテナンス不良が発生した期間があり雨量データ、気温データが欠測となっている時期がある。

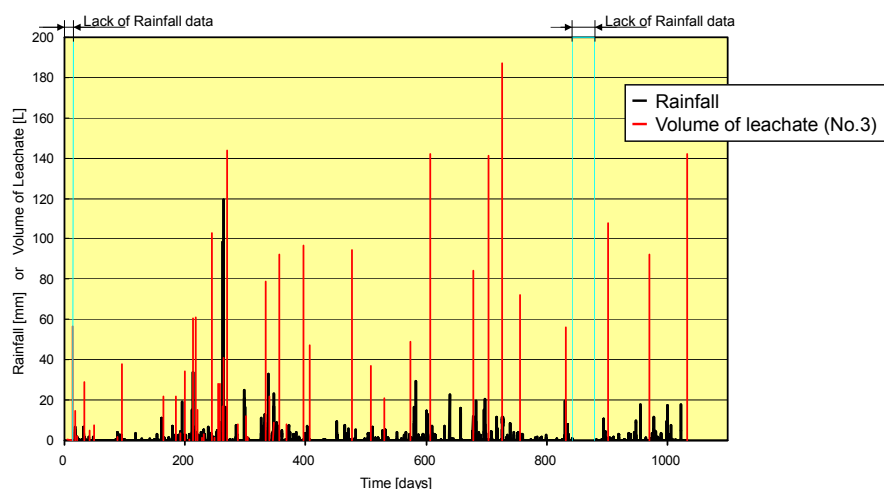


図 4.4 実験期間中の降雨状況と浸出水採水量の例

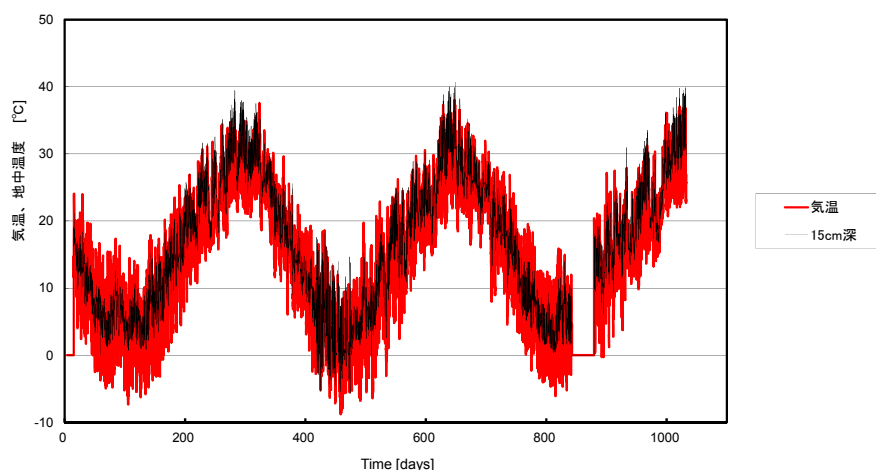


図 4.5 実験期間中の気温、地中温度

(2) NP と E2 の挙動

ライシメータからの浸出水の TOC 濃度の推移を図 4.6 に示す。ケース 2 (土壌+薬品) のデータが大きくぶれていたことから、ケース 2 のデータを除き 0~100mg/L を拡大した図を右図に示した。ライシメータ設置初期は TOC 濃度が高かったが、実験開始 100 日程度 (累積流出量約 100L 程度) までに急激に濃度は低下した。なお、260 日目頃にあるピークは、その前の強い降雨 (図 4.4) の影響を受けたものと考えられる。期間全般を通して、コンポストを施用したケースでの TOC 濃度が高めの値を示した。

ライシメータからの浸出水中の NP、E2 濃度の推移を図 4.7 に示す。横軸は浸出水の累積量として表示した。グラフの面積は各採水期間での各物質の流出量に相当する。各ライシメータで土壌の締固めが異なり、浸出水量が異なっていたため、各ライシメータでグラフの幅は異なっている。図 4.7 によると、NP、E2 についても、TOC と同様、実験初期に比較的高濃度での浸出が見られた。Jacobsen らのライシメータ実験⁷⁾や Brown らの温室での実験⁸⁾では NP は浸出水中から検出されないと報告しているが、コンポスト施用量等、実験条件は異なるものの、この実験では実験開始直後に最大約 2.7 $\mu\text{g/L}$ (ケース 3) 検出された。NP 濃度はこの後低下し、累積浸出水量にして 100L 程度からは比較的低濃度で推移していた。この実験でのコンポスト施用量が通常使用されている施用量に比べて多い条件であり、また、ライシメータの構造上この浸出水濃度がそのまま地下水での NP 濃度を表しているわけではなく、対照系 (ケース 1) でも初期浸出水で 1.9 $\mu\text{g/L}$ の NP が検出されている状況ではあるが、仮に表 1.3 の河川水の基準値 (生物特 A : 年間平均値 0.6 $\mu\text{g/L}$) および EU の Directive (平均 0.3 $\mu\text{g/L}$ 、最大 2.0 $\mu\text{g/L}$)⁹⁾と比較すると、コンポスト施用初期にこれらの値を超えたこととなる。

コンポストを施用したライシメータ (ケース 3~6) について、NP、E2 と TOC の浸出水中での濃度の比を図 4.8 に示す。E2/TOC は初期を除いて 10^{-7} 程度を示し、E2 は TOC と同様の浸出機構によって浸出している可能性があると考えられる。NP/TOC 比については、長期的には低下傾向に

あるように見えるが、一定の傾向があるとまでは言えないと考えられる。

対照系（ケース 1）の初期 NP/TOC 比は 10^{-3} 程度でコンポスト施用系より率が高く、土壌のみの系とコンポスト施用系での NP の収着の差によるものと考えられるが、双方の強熱減量の間で 3 ポイント程度（比率ではコンポスト系が対照系の 1.3 倍程度）の差しかいないため、収着の差のみによる結果であるとは断定できなかつた。また、NP、E2 の初期浸出について、図 4.7 に基づいてコンポスト施用系と土壌のみの系の浸出水中濃度を比較すると、NP では 1.4~1.9 倍、E2 では 20 倍以上の差があり、NP の方がコンポストにより強く収着しているものと考えられる。これは表 1.1、表 1.2 で示された Kow 値の大小関係とも矛盾はしていなかつた。

各ライシメータの初期土壌中 NP、E2 存在量に占める、浸出した NP、E2 の累積量を累積浸出率としてまとめ、図 4.9 に示す。横軸は累積浸出水量を以下の通り、無次元化した値である。

$$B.V. \equiv (\text{累積浸出水量}) / (\text{土壌嵩体積})$$

今回の実験期間では分析値に基づく初期土壌中存在量に対して NP で 0.34~13%（コンポスト混入系では 0.34~0.69%）、E2 で 0.55~8.1%（コンポスト混入系では 1.6~5.3%）が浸出水とともにライシメータ外に排出されていた。

土壌の NP、E2 含有量、土壌中残留率の推移を図 4.10、図 4.11 に示す。これらは、各ライシメータの上層、下層の土壌試料の平均値から算出した。含有量の分析には検討すべき課題が多く、分析結果の傾向を判断することが困難であるが、NP については B.V. で 0.5 程度以降は減少傾向にあり、ケース 3（土壌+コンポスト）では初期 $700\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ が 249 日目（B.V. 約 1.6）には $43\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ にまで減少していた。

図 4.9、図 4.11 の比較から、NP、E2 の減少は浸出水による排出以外の機構による減少が主であると考えられる。表 1.1 の通り E2 の大気への揮発は無視できる。また、表 1.2 より NP は大気への放散の可能性は否定できないが、フガシティモデルの検討で大気中での存在は無視できるとされており¹⁰⁾、主な土壌含有量減少機構とは考えにくいことから、ライシメータ内での化学的または生物学的分解等により他の物質に変化したことが主な減少機構であると考えられる。

コンポスト施用土壌中での半減期を図 4.11 のケース 3、4 の結果に基づいて算出すると、NP で約 130~140 日、E2 では分析結果が安定していないものの約 190~250 日であった。

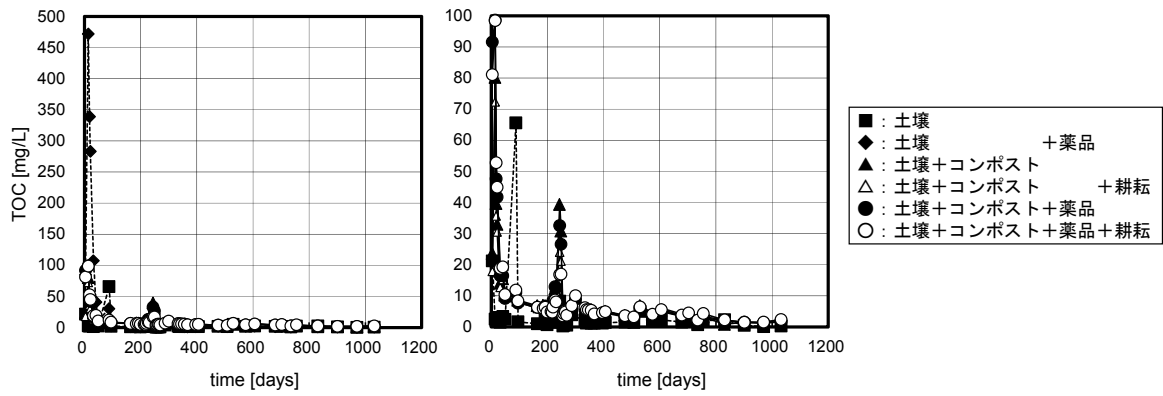


図 4.6 ライシメータからの浸出水の TOC 濃度の推移

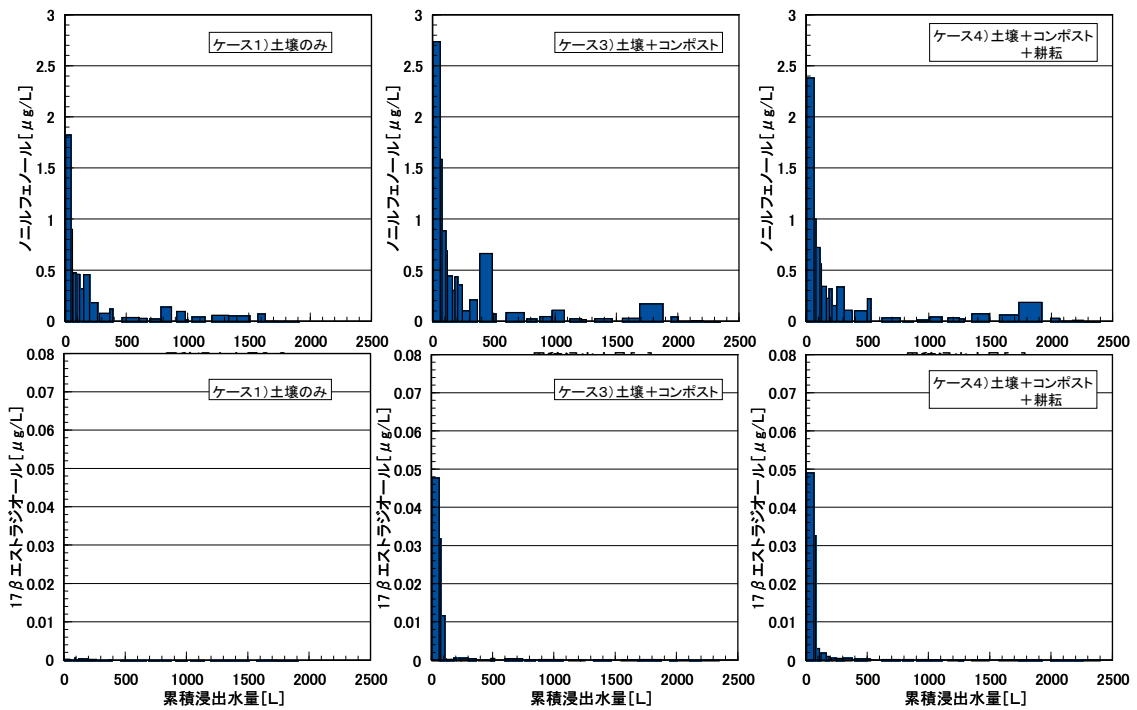


図 4.7 ライシメータからの浸出水中の NP、E2 濃度の推移

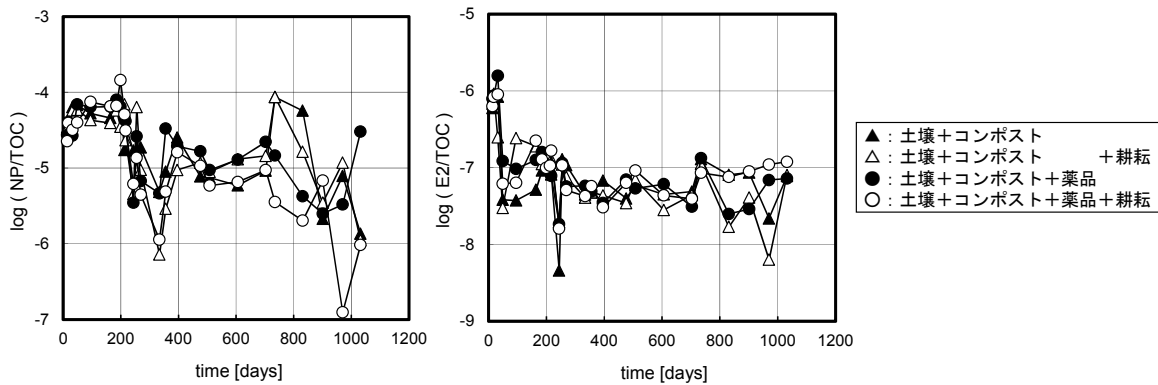


図 4.8 ライシメータからの浸出水中の NP、E2 濃度と TOC 濃度の比

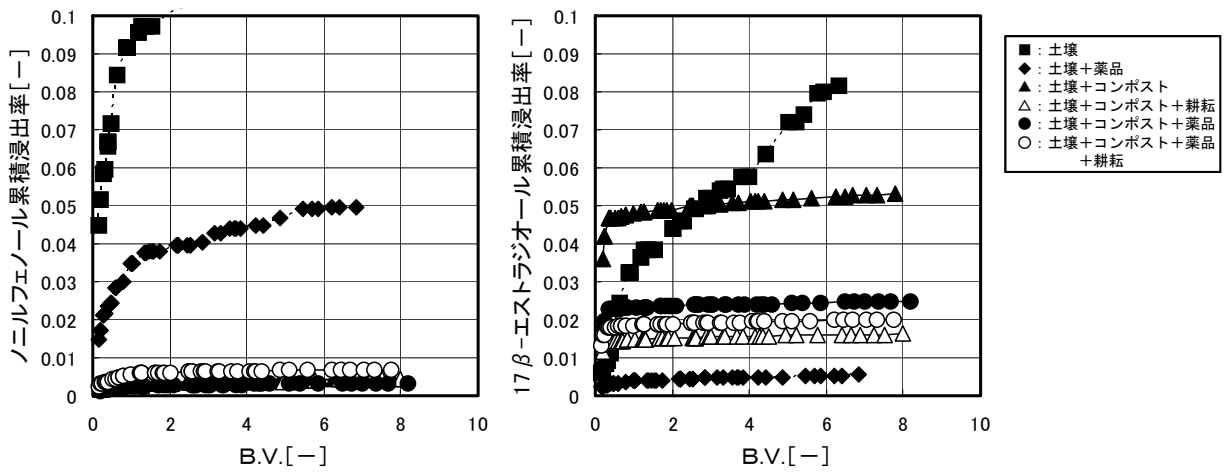


図 4.9 ライシメータからの NP、E2 の累積浸出率

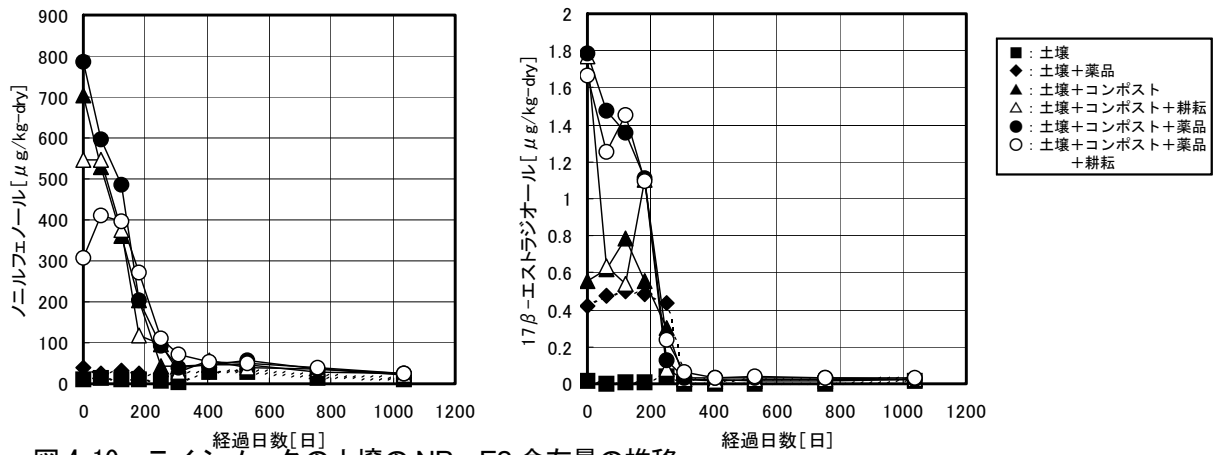


図 4.10 ライシメータの土壌の NP、E2 含有量の推移

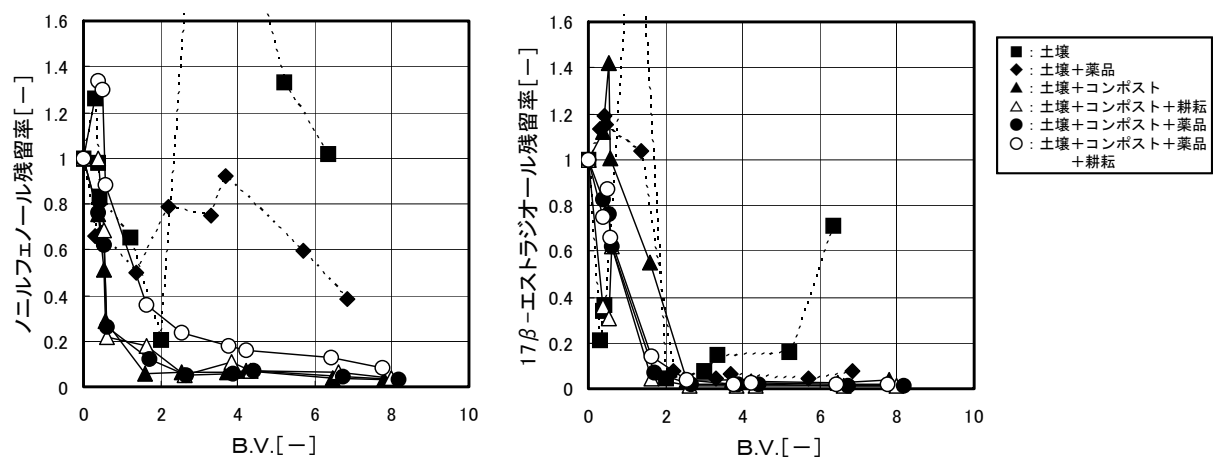


図 4.11 ライシメータの土壌中の NP、E2 残留率

(3) NP 類の挙動

NP 類の土壌中での生物分解経路が図 3.1 と同様であると仮定すると、土壌中の NPnEO も含めた解析が必要である。以下では、総 NP 類の量として、NPnEO($n \leq 4$)、NPnEO($n \geq 5$)として得られた実験結果を分子量の比率を用いて NP 相当量に換算して用いる。分析定量時にそれぞれ $n=2$ 、 $n=10$ の標準物質を使用しているため、 $n=2$ 、 $n=10$ の分子量を換算に用いた。

土壌の上層、下層の NP、NPnEO の推移を、コンポストを施用し、耕耘を行わなかったケース 3、ケース 5 についてまとめ、図 4.12 に示す。左の図は NP、NPnEO($n \leq 4$)、NPnEO($n \geq 5$)毎に、右の図では総 NP 類の含有量を示した。NP、NPnEO($n \leq 4$)は早い段階で含有量が減少し、200 日で 20%未満となっていた。一方、NPnEO($n \geq 5$)は減少に転ずるまでに 200 日以上かかっていることが明らかとなった。Sjöström ら¹⁴⁾は NP12EO を用いた実験で非常に速い分解速度を報告しているが、ここでは NPnEO($n \geq 5$)の減少が始まるまでに長期を要していた。NPnEO($n \geq 5$)の 200 日以降の減少が NP、NPnEO($n \leq 4$)の含有量の増加として現れていないことから、200 日までに土壌微生物が NP、NPnEO($n \leq 4$)の高い分解能力を獲得し、NPnEO($n \geq 5$)からの分解物の影響があらわれにくかった可能性がある。また、図 3.1 に示された分解とは別の減少経路をとっている可能性もあると考えられる。

土壌の NP、総 NP 類の含有量を土壌の上層、下層での比として図 4.13 に示す。実験開始 200 日程度で大きなぶれが生じており、一定の傾向を把握しにくい。実験初期の総 NP 類の値が 1 未満となっており、土壌上層での総 NP 類含有量の低下が速く進む傾向が見られた。地表近傍での太陽光による分解、地表からの揮散の可能性も否定できないが、総 NP 類の大部分を NPnEO($n \geq 5$)が占めていたことから、降雨により下層へ移動した、上層の酸素濃度等の環境条件がより分解に有利であったという可能性が考えられる。なお、NP のみに着目すると薬品 (NP) を添加したケース 5 については上層、下層の比がほぼ 1 で推移しており、上層、下層での差があまりなかったことを示しているため、土壌への薬品添加実験での NP 減少機構は、実際のコンポスト施用での NP 減少機構とは異なっている可能性が否定できないと考えられる。

総 NP 類の土壌残留率と浸出水に含まれて排出された累積浸出率を、コンポストを施用したケースについてまとめ、図 4.14 に示す。双方とも、当初の各土壌の総 NP 類含有量 (測定値) を基準として算出した。土壌残留率が大きく減少している一方で、累積浸出量は最も多かったケース 3 でも 0.4%程度であった。したがって、土壌中の総 NP 類の減少についても浸出水による排出以外の機構による減少が主である可能性が高い。表 1.2 より NPnEO の大気への放散の可能性は考えにくいので、ライシメータ内での化学的または生物学的分解等により他の物質に変化したことが主な減少機構であると考えられる。なお、コンポスト施用土壌中での総 NP 類の半減期を図 4.12 のケース 3、図 4.14 のケース 3、4 の結果に基づいて算出すると、約 220 日であった。ライシメータ実験で得られた総 NP 類、E2 の半減期が 200 日程度となっていることから、土壌改良に下水汚泥コンポストを毎年使用した場合、これらの物質の蓄積の可能性は否定できず、より詳細な研究が必要であると考えられる。

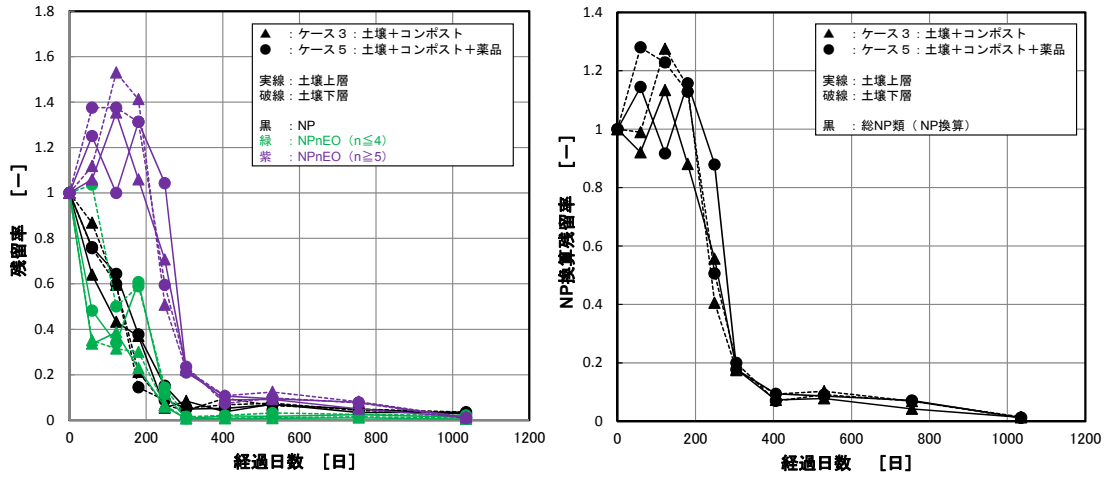


図 4.12 ライシメータの土壤上層、下層での NP、NPrEO 残留率 (左)、総 NP 類残留率 (右)

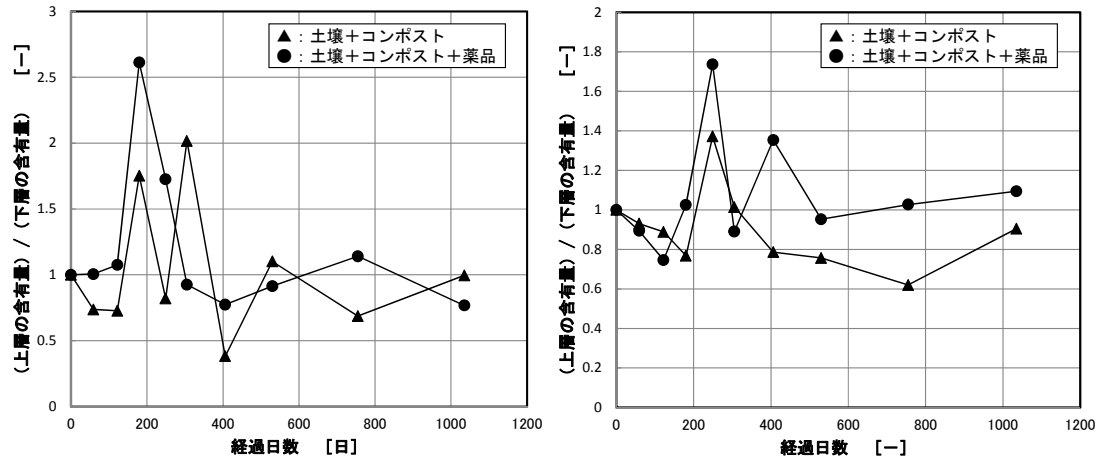


図 4.13 ライシメータの土壤上層、下層の NP (左)、総 NP 類 (右) 含有量の比

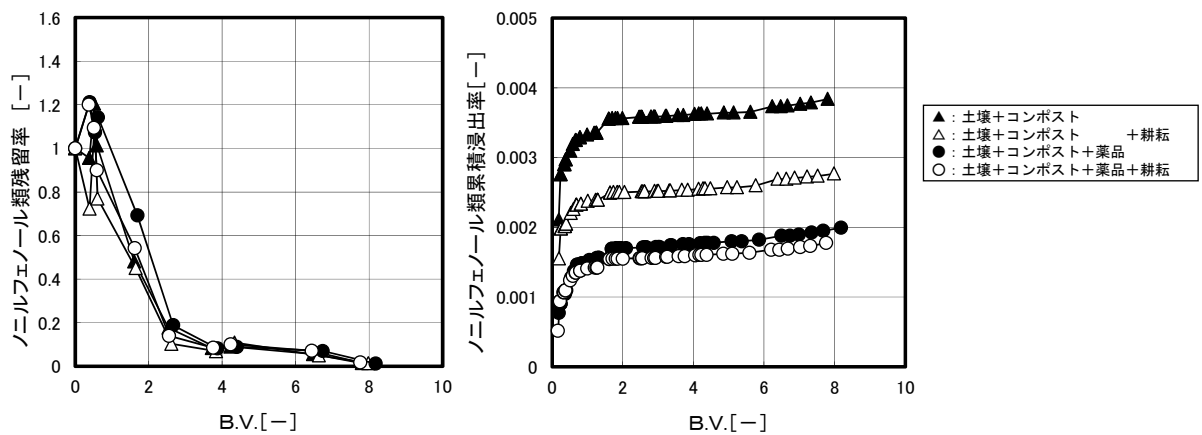


図 4.14 ライシメータ土壤中の総 NP 類の残留率と累積浸出率

4.3 植物体への移行確認実験

4.3.1 実験方法

基本的な実験条件は植害試験方法¹²⁾を参考として設定した。

ステンレスバット（312mm×520mm×h134mm）に表 4.2、表 4.3 のとおりに調整した土壌を充填した。基礎土壌はライシメータ実験（4.2 節参照）で用いたものと同様の赤土と、沸騰石を 3 : 1 で混合したものである。窒素、りん酸、カリ分の調整には過りん酸石灰、硫酸アンモニウム、塩化カリウムを用いた。添加したコンポストは、生汚泥起源の塩鉄石灰系脱水汚泥から製造されたものを用いた。ここで設定したコンポストの添加量（約 0.36kg/m²、約 2.2kg/m²）は、ライシメータ実験での添加量（約 6kg-dry/m²）より少ない。これは、今回の実験方法における植物栽培では、コンポストを多く添加した条件での植物の成長が必ずしも低濃度添加条件よりも旺盛となるわけではなく、コンポスト添加量をここで設定した条件よりも多くすることは適切ではないと考えられたことによるものであり、都道府県における下水汚泥の施用基準等²⁾と比べても、より実態に即した値である。

土壌を充填したバットに市販の小松菜、ラディッシュの種をまき、それぞれ表 4.2、表 4.3 に示す期間の栽培を行った（写真 4.2）。栽培時の水分調整は、バット全体の重量を一定に保つように精製水を添加することで行った。

その後、植物体を収穫し、NP 類の分析を行った。

植物体（茎、葉）中の NP 類の分析は第 2 章で示した高速溶媒抽出法を用いる方法を参考としつつ、クリーンアップのための固相抽出操作（Sep-Pak plus C₁₈）を行った。また、土壌、植物体（根）中の NP 類の分析では固相抽出操作は省いた。いずれも、抽出には ASE-200（Dionex 社、メタノール、13.8MPa（2000psi）、100℃、10 分）を用いた。NP 類の測定には HPLC（Waters 2690、蛍光検出器：Waters 474、カラム：GL サイエンス社 Inertsil Ph 5μm、φ 4.6×150mm）を用いた。なお、根の中の NP 類の分析にあたっては、超音波洗浄器等を用いて根と栽培に用いた土壌の分離を行ったが、完全な分離は困難であった。

4.3.2 実験結果

栽培実験後の植物体中の NP 類含有量を表 4.2、表 4.3 に示す。分析に供することができた試料の絶対量が少なかったこともあるが、小松菜もラディッシュも、定量が可能な濃度域での NP 類の植物体への移行はほとんど確認できなかった。NP は検出下限値に至らず、NPnEO についても、定量下限に至らなかった。NPnEO の定量下限未満の分析参考値を比較しても、コンポストの添加条件の差の影響はみられなかった。

表 4.2 植物栽培実験の実験条件と結果（小松菜）

播種		無播種			播種(230粒/バット)				
コンポスト		なし	1430mg- N相当/ バット	8580mg- N相当/ バット	なし	1430mg- N相当/ バット	8580mg- N相当/ バット		
化学肥料		N、P2O5、K2Oで各1001mg/バット							
栽培日数		56日							
実験 終了時	土壌	NP	ND	Tr(0.02)	0.07	ND	ND	0.4	
		NPnEO (n≤4)	ND	ND	0.3	ND	ND	0.2	
		NPnEO (n≥5)	0.07	0.1	0.3	0.1	0.2	0.3	
	植物 体	茎葉	NP	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≤4)	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≥5)	-	-	-	ND	Tr(0.4)	Tr(0.4)
		根	NP	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≤4)	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≥5)	-	-	-	Tr(0.7)	Tr(1)	Tr(0.8)

注)単位: $\mu\text{g/g-dry}$ 、ND: 検出下限未満、Tr: 検出下限以上定量下限未満

表 4.3 植物栽培実験の実験条件と結果（ラディッシュ）

播種		無播種			播種(8粒/バット)				
コンポスト		なし	1430mg- N相当/ バット	8580mg- N相当/ バット	なし	1430mg- N相当/ バット	8580mg- N相当/ バット		
化学肥料		N、P2O5、K2Oで各1001mg/バット							
栽培日数		42日							
実験 前	土壌	NP	ND	Tr(0.01)	0.06	ND	Tr(0.02)	0.1	
		NPnEO (n≤4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		NPnEO (n≥5)	ND	ND	0.05	ND	Tr(0.01)	Tr(0.02)	
実験 終了時	土壌	NP	0.04	ND	0.09	0.03	0.03	0.07	
		NPnEO (n≤4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		NPnEO (n≥5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	植物 体	葉	NP	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≤4)	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≥5)	-	-	-	ND	ND	ND
		根	NP	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≤4)	-	-	-	ND	ND	ND
			NPnEO (n≥5)	-	-	-	ND	ND	ND

注)単位: $\mu\text{g/g-dry}$ 、ND: 検出下限未満、Tr: 検出下限以上定量下限未満



写真 4.2 植物栽培実験の様子（小松菜）

4.4 まとめ

下水処理場への内分泌かく乱化学物質の流入が報告されており、それらが水処理系から汚泥処理系へ移行する可能性が指摘されている。本章では、下水汚泥リサイクル製品施用先での内分泌かく乱物質の挙動・消長を明らかにすることを目的として、ライシメータを用いたコンポスト施用土壌からの内分泌かく乱物質浸出実験、及び植物体への移行確認実験を行った。その結果、以下が明らかとなった。

- ・ ライシメータを用いたコンポスト施用土壌からの内分泌かく乱物質浸出実験を行ったところ、降雨による NP 類、E2 の累積浸出率は、総 NP 類で初期土壌中存在量の 0.4%以下 (NP は 0.34~0.69%)、E2 では 1.6~5.3%であり、コンポスト施用土壌中の NP 類、E2 が降雨により浸出する量は少ないことが明らかとなった。総 NP 類、E2 の累積浸出率と土壌中残留率から、NP 類、E2 は、土壌中での化学的または生物学的分解等により他の物質に変化したと考えられた。本実験で得られたコンポスト施用土壌中での総 NP 類の半減期は約 220 日、E2 の半減期は約 190~250 日であった。
- ・ コンポスト施用土壌中の内分泌かく乱物質の植物体への移行に関する検討を小松菜等を用いて行ったところ、分析が可能な濃度域での NP 類の植物体への移行は確認できなかった。

コンポスト施用土壌での内分泌かく乱物質の挙動について、本研究では NP 類の変化について主に着目したが、エストロゲンについても抱合体を含めた物質の変化を考慮した解析が必要であると指摘されていることから¹³⁾、今後、より詳細な検討が必要であると考えられる。

下水汚泥リサイクル製品の利用については、微生物、有機および無機の汚染物質によって引き起こされる環境および人体の健康への潜在的なリスクを考慮すべきことが指摘されてきたが、土壌、農用地における化学物質の挙動は複雑であり、リスクについて一定の結論を出せる段階には未だに至っていないと考えられる。Domene らは、NP 類が植物や土壌中無脊椎動物に与える影響について、通常であれば生態毒性リスクは低いとしているものの、下水汚泥リサイクル製品の施用率の変化等、不確定な要素が多いことも指摘している¹⁴⁾。生態リスクについて、内分泌かく乱物質も含めた検討も行われているが、毒性データの充実も含め、土壌環境を対象とした研究の必要性が指摘されている¹⁵⁾。本研究では植物体への移行は確認されなかったが、再生水からの経路も含め、土壌から植物体への内分泌かく乱物質の移行が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。農作物経由の NP がもたらすヒトの健康リスクを指摘している報告¹⁷⁾もあるが、内分泌かく乱物質等、微量化学物質がもたらすリスクに関連する情報は不十分で、今後も研究を進める必要がある¹⁸⁾¹⁹⁾。本研究の成果は、これらの研究の進展に資するものであると考えられる。

第4章参考文献

- 1) 森田弘昭、落修一、川嶋幸徳 (2000) : 下水汚泥中内分泌かく乱物質の消長に関する調査、平成 11 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 3755、pp.217-222、建設省土木研究所.
- 2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部 (2001) : 平成 12 年度 下水道における内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) に関する調査報告.
- 3) 下水汚泥資源利用協議会 (1996) : 下水汚泥の農地・緑地利用マニュアル、pp.207-238、下水汚泥資源利用協議会.
- 4) 建設省都市局下水道部監修 (1999) : 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル、pp.48-55、(社) 日本下水道協会.
- 5) 高橋明宏、小森行也、矢古宇靖子、岡安祐司、斉藤正義、東谷忠、田中宏明 (2000) : 下水試料中の女性ホルモン測定法の課題—LC/MS/MS と ELISA の比較から—、第 3 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.175-176、(社) 日本水環境学会.
- 6) 小森行也、八十島誠、田中宏明 (2002) : LC/MS/MS によるエストロゲンの分析、第 36 回日本水環境学会年会講演集、p.431、(社) 日本水環境学会.
- 7) Jacobsen,A.M., Mortensen,G.K. and Hansen,H.C.B. (2004) : Degradation and Mobility of Linear Alkylbenzene Sulfonate and Nonylphenol in Sludge-Amended Soil, *Journal of Environmental Quality*, 33(1), pp.232-240.
- 8) Brown,S., Devin-Clarke,D., Doubrava,M. and O'Connor,G. (2009) : Fate of 4-nonylphenol in a biosolids amended soil, *Chemosphere*, 75(4), pp.549-554.
- 9) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- 10) 環境省環境保健部 (2001) : 平成 12 年度環境負荷量調査の結果について、pp.201-204、平成 13 年度第 2 回内分泌攪乱化学物質問題検討会、平成 13 年 10 月 3 日、資料 5.
- 11) Sjöström,Å.E., Collins,C.D., Smith,S.R. and Shaw,G. (2008) : Degradation and plant uptake of nonylphenol (NP) and nonylphenol-12-ethoxylate (NP12EO) in four contrasting agricultural soils, *Environmental Pollution*, 156(3), pp.1284-1289.
- 12) 植物に対する害に関する栽培試験の方法、昭和 59 年 4 月 18 日付け 59 農蚕第 1943 号農林水産省農蚕園芸局長通知.
- 13) Shrestha,S.L., Casey,F.X.M., Hakk,H., Smith,D.J. and Padmanabhan,G. (2012) : Fate and Transformation of an Estrogen Conjugate and Its Metabolites in Agricultural Soils, *Environmental Science and Technology*, 46(20), pp.11047-11053.
- 14) Domene,X., Ramírez,W., Solà,L., Alcañiz,J.M. and Andrés,P. (2009) : Soil pollution by nonylphenol and nonylphenol ethoxylates and their effects to plants and invertebrates, *Journal of Soils and Sediments*, 9(6), pp.555-567.

- 15) Thomaidi,V.S., Stasinakis,A.S., Borova,V.L. and Thomaidis,N.S. (2016) : Assessing the risk associated with the presence of emerging organic contaminants in sludge-amended soil: A country-level analysis, *Science of The Total Environment*, 548-549, pp.280-288.
- 16) Shargil,D., Gerstl,Z., Fine,P., Nitsan,I. and Kurtzman,D. (2015) : Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants, *Science of The Total Environment*, 505, pp.357-366.
- 17) Wang,S., Liu,F., Wu,W., Hu,Y., Liao,R., Chen,G., Wang,J. and Li,J. (2018) : Migration and health risks of nonylphenol and bisphenol a in soil-winter wheat systems with long-term reclaimed water irrigation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, pp.28-36.
- 18) Careghini,A., Mastorgio,A.F., Saponaro,S. and Sezenna,E. (2015) : Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8), pp.5711-5741.
- 19) Adeel,M., Song,X., Wang,Y., Francis,D. and Yang,Y. (2017) : Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, *Environment International*, 99, pp.107-119.

第5章 結 論

社会に関わる多くの物質の中で、人や野生生物の内分泌作用をかく乱し、生殖機能阻害等を引き起こす可能性があると思われる物質等（内分泌かく乱物質）による環境汚染が各国で報告されており、日本でも環境中に広範囲にわたって存在していることが明らかとなっている。

本研究は、1990年代からその内分泌かく乱作用が疑われていたノニルフェノール類を中心に、下水道システムの中での内分泌かく乱物質の挙動、特に下水汚泥処理系での挙動、さらにコンポスト等の下水汚泥リサイクル製品として施用されたのちの挙動を明らかにすることを目的とし、下水汚泥試料中のノニルフェノール類の分析手法、下水汚泥処理系におけるノニルフェノール類の挙動、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動について検討した。成果を以下にまとめる。

第1章では、本研究の背景を整理するとともに、本研究が対象とする範囲を示した。

本研究では内分泌かく乱物質、とくに1990年代より生態系への影響を及ぼす可能性が懸念されていたエストロゲンとノニルフェノール類（NP類）に着目した。エストロゲンとNP類の下水処理場内での挙動については、主に水処理系に注目した研究は進んでいるものの、汚泥処理系での挙動に関する知見は不十分である。これは、内分泌作用のかく乱が懸念されている対象が主に水環境中の生物やその生態系であり、人間社会から水環境に至る主要な負荷が下水処理水であることに加え、有機物が多く含まれる汚泥試料中の微量有機物の分析が技術的に困難であることによるものと考えられる。内分泌かく乱物質については十分な知見が得られておらず、今後も検討を進めていく必要性が指摘されており、下水処理場全体としてのこれらの物質の挙動や、下水汚泥の排出先での挙動に関する知見を深めることは、環境全体の中での下水道システムの役割を理解するうえでも必要である。エストロゲンについては、汚泥処理系の嫌気環境下での分解が期待できないとされている一方で、NP類についてはNPとその前駆物質の挙動に関する知見が少なく、下水汚泥リサイクル製品の施用先でのこれらの物質の挙動についても知見が少ない。そこで、本研究は、下水汚泥試料中のNP類の分析手法の提案、下水汚泥処理系におけるNP類の挙動の解明、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動の解明を行うこととした。

第2章では、下水汚泥試料中のNP類の分析手法を検討した。

有機物の多い下水汚泥試料を対象としたNP類の抽出方法の検討を行った。その結果、余剰活性汚泥からのNP、その主な前駆物質であるノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）の抽出に高速溶媒抽出（PFE）法を用いることで、一般的に用いられている加熱還流法による抽出と比較し、抽出時間が1/4以下で、1.03～1.3倍のNP類を抽出することが可能との結果を得たため、PFE法を下水汚泥試料中のNP類の抽出方法として提案した。また、下水汚泥試料中のNP前駆物質のうちノニルフェノールエトキシカルボン酸（NPnEC）の分析手法の検討を行ったが、水試料中のNPnECの分析に用いられる前処理方法の応用では分析が困難であることが明らかとなった。

第3章では、下水汚泥処理系におけるNP類の挙動を検討した。

下水汚泥処理系における内分泌かく乱物質の挙動に関する先行研究では、嫌気性消化により内分泌かく乱物質含有量が多くなる結果が得られていたことから、本検討では、下水汚泥処理系におけるNP類の挙動をより詳細に明らかにするため、前駆物質の消長を対象とした嫌気性消化室内実験を行った。実下水処理場より採取された濃縮汚泥を用い、滞留時間約28日、35°Cで運転している嫌気性消化実験装置にNPの前駆物質の一つであるNP1EOを投入したところ、約40%に相当する量がNPとして消化汚泥中に存在することが明らかとなった。また、NPの前駆物質の一つであるNP1ECおよびNP2ECを投入した。その結果、投入したNP1ECのほぼ全量に相当する量がNPとして消化汚泥中に存在することが確認された。一方、NP2ECに関しては、NP濃度に影響しなかった。これらにより、35°Cの中温消化条件では、NP1EO、NP1ECからNPが生成することが示された。NPのエストロゲン様活性はこれらの前駆物質よりも高いとされていることから、汚泥処理過程で汚泥の安定化が進んでいるにもかかわらず、NP類については反応が進み、見かけ上、エストロゲン様活性が高くなることが明らかとなった。

第4章では、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動を検討した。

下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動を把握するため、ライシメータを用いたコンポスト施用土壌からの内分泌かく乱物質浸出実験を行った。約2年10ヶ月の実験の結果、降雨による総NP類（NP類をNPに換算した総量）の累積浸出率はコンポスト土壌中初期存在量の0.4%以下、E2では1.6~5.3%であった。総NP類、E2それぞれの累積浸出率と土壌中残留率から、NP類、E2の多くは他の物質に変化していると考えられた。

また、コンポスト施用土壌中の内分泌かく乱物質の植物体への移行に関する検討を小松菜等を用いて行ったところ、分析が可能な濃度域でのNP類の植物体への移行は確認できなかった。

本研究では下水汚泥試料中のNP類の分析手法、下水汚泥処理系におけるNP類の挙動、下水汚泥リサイクル製品の施用先における内分泌かく乱物質の挙動について基礎的知見を得た。その結果、NP類については、下水処理場において汚泥処理系に到達した場合、嫌気性消化過程でNP1EOの約40%、NP1ECのほぼ全量に相当するNPが消化汚泥中に蓄積していた。コンポスト化過程でも完全に分解することは期待できないことから、コンポスト等の下水汚泥リサイクル製品にNP類が含まれることとなると考えられた。一般的な施用量でコンポストを用いた場合、NP類、E2の多くは土壌環境中で他の物質に変化した。本研究で確認した範囲では、NP類の浸出総量は当初コンポスト施用土壌中に存在した総NP類の0.4%以下であり、植物体への移行も確認できなかった。E2についてもその多くは他の物質に変化し、浸出総量は当初コンポスト施用土壌中に存在したE2の5.3%以下であった。

近年、ダイオキシン類、多環芳香族炭化水素類、ペルフルオロ化合物類（PFCs）等の有機フッ素化合物、医薬品及び生活関連物質（Pharmaceuticals and Personal Care Products: PPCPs）、マ

マイクロプラスチックなど、各種の化学物質等が環境（人、生態系）に及ぼす影響が指摘され、下水試料、環境試料を対象とした分析方法の開発、存在実態の解明、挙動の解明、対策手法の開発、影響の評価が進められている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。さらに、着目されていない物質に関する情報の欠落を指摘する報告もある⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。これらの物質のなかには、本研究で対象とした NP 類のように、前駆物質の影響が懸念される PFCs などの物質群もある³⁾。NP 類についても検討を進めていく必要性が指摘されており¹²⁾、今後も、下水道分野における前駆物質までも含めた化学物質等を対象とした研究を進める必要があると考えられる。

第5章参考文献

- 1) 小森行也、田中宏明、八十島誠、南山瑞彦、鈴木穰、三宅祐一、加藤みか、浦野紘平 (2004) : ダイオキシン類簡易分析技術の底泥対策への利用と課題、環境システム計測制御学会誌、9(2)、pp.133-140.
- 2) 南山瑞彦、鈴木穰 (2004) : 湖沼底泥中の多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の存在実態と対策の可能性、環境工学研究論文集、41、pp.497-506.
- 3) 鈴木裕識、田中周平、藤井滋穂、中田典秀、石川一真、Jira KONGPRAN、齋藤憲光 (2014) : 下水処理過程における前駆体からの生成を考慮したペルフルオロカルボン酸類の挙動の検討、土木学会論文集 G (環境)、70(7)、pp.III_55-III_64.
- 4) 森田匡一、村山康樹、小森行也、南山瑞彦 (2012) : 藻類生長阻害からみたレボフロキサシンの塩素処理の評価、環境化学、22(4)、pp.183-192.
- 5) Komori,K., Suzuki,Y., Minamiyama,M. and Harada,A. (2013) : Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(6), pp.4529-4536.
- 6) 真野浩行、村山康樹、鈴木穰、中田典秀、南山瑞彦 (2013) : PRTR 情報等を活用した下水処理水中に含まれる化学物質の環境リスク初期評価、下水道協会誌論文集、50(612)、pp.85-93.
- 7) Verlicchi,P. and Zambello,E. (2015) : Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review, *Science of The Total Environment*, 538, pp.750-767.
- 8) Carr,S.A., Liu,J. and Tesoro,A.G. (2016) : Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants, *Water Research*, 91, pp.174-182.
- 9) Grandjean,P., Eriksen,M.L., Ellegaard,O. and Wallin,J.A. (2011) : The Matthew effect in environmental science publication: A bibliometric analysis of chemical substances in journal articles, *Environmental Health*, 10:96.
- 10) Daughton,C.G. (2014) : The Matthew Effect and widely prescribed pharmaceuticals lacking environmental monitoring: Case study of an exposure-assessment vulnerability, *Science of The Total Environment*, 466-467, pp.315-325.
- 11) Schug,T.T., Johnson,A.F., Birnbaum,L.S., Colborn,T., Guillette,Jr.,L.J., Crews,D.P., Collins,T., Soto,A.M., vom Saal,F.S., McLachlan,J.A., Sonnenschein,C. and Heindel,J.J. (2016) : Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions, *Molecular Endocrinology*, 30(8), pp.833-847.
- 12) Acir,I.-H. and Guenther,K. (2018) : Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation, *Science of The Total Environment*, 635, pp.1530-1546.

本研究に関連する査読論文

本研究の成果の一部を、査読論文として発表した。

(第2章関連)

Mizuhiko Minamiyama, Shuichi Ochi and Yutaka Suzuki (2008): Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from sewage sludge using the pressurized fluid extraction method and the supercritical fluid extraction method, *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(13), pp.1511-1515.

(第3章関連)

Mizuhiko Minamiyama, Shuichi Ochi and Yutaka Suzuki (2006): Fate of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenoxy acetic acids in an anaerobic digestion process for sewage sludge treatment, *Water Science and Technology*, 53(11), pp.221-226.

(第4章関連)

Mizuhiko Minamiyama, Shuichi Ochi and Yutaka Suzuki (2008): Fate of nonylphenol and 17 β -estradiol contained in composted sewage sludge after land application, *Water Science and Technology*, 57(2), pp.167-174.

以上

謝 辞

本研究の集成にあたり、長期にわたり終始懇切なる御指導、御助言を賜りました 高橋 正宏 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門特任教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、多くの有益な御助言を賜りました北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 岡部 聡 教授、北海道大学大学院工学研究院環境循環システム部門 五十嵐 敏文 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は、主に著者が建設省土木研究所下水道部汚泥研究室、独立行政法人土木研究所材料地盤研究グループリサイクルチームに所属していた時期に行った研究をとりまとめたものです。この間、御指導、御助言をいただいた国土交通省国土技術政策総合研究所下水道研究部、独立行政法人土木研究所水循環研究グループ水質チーム、材料地盤研究グループリサイクルチームの先輩、後輩諸氏、特に多くの御指導をいただきました鈴木穰氏、落修一氏に深く感謝申し上げます。本研究の実施にあたり多大なる御協力を頂きました、松井祥夫氏、久保田（渡辺）礼子氏をはじめとする実験、分析を担当していただいた皆様に深く感謝申し上げます。本研究で使用した下水汚泥試料を御提供いただいた地方公共団体の皆様に感謝申し上げます。最後に、常に支えてくれた家族への感謝の気持ちを記します。

2018年12月

南 山 瑞 彦